

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Ježková

Mechanismy účinků esenciálních olejů na houby
Mechanisms and mode of action of essential oils on fungi

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5. 2019

.....

Tereza Ježková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiči doc. Ondřeji Koukolovi za cenné připomínky, trpělivost, a opravdu dobré vedení při psaní bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat i rodině a přátelům za jejich podporu.

Abstrakt

Esenciální oleje jsou těkavé látky z rostlin se širokým spektrem účinků. Mnohé z nich vykazují antifungální aktivitu. Poněvadž stále narůstá rezistence patogenních hub k antimykotikům, je nalezení nových antifungálních látek pro léčbu mykotických infekcí velice potřebné. Aby mohly být esenciální oleje využity pro výrobu nových léků, je nezbytné znát přesný mechanismus jejich účinku. O vlivu esenciálních olejů na houby se ví sice mnoho, nicméně na co konkrétně v buňce cílí není vždy známo. V této práci shrnuji dosavadní poznatky o mechanismech účinků na houby. Postupně se věnuji vlivu esenciálních olejů na buněčnou stěnu, plazmatickou membránu, mitochondrii, jádro, quorum sensing, virulenční faktory, produkci mykotoxinů a na vývoj houby. Esenciální oleje zpravidla nepůsobí jen na jednu strukturu, ale ovlivňují více struktur a procesů zároveň. V závěrečné kapitole zmiňuji možné směry dalšího výzkumu těchto látek.

Klíčová slova: esenciální oleje, houby, antifungální aktivita, mechanismus účinku

Abstract

Essential oils are volatile compounds from plants with a wide range of effects. Many of them exhibit antifungal activity. As the resistance of pathogenic fungi to antimycotics is increasing, finding new antifungal agents for the treatment of fungal infections is highly desirable. In order to use essential oils for the production of new drugs, it is necessary to know the exact mechanism of their action. Although it is known a lot about the effects of essential oils on fungi, the particular target in a cell is not always described. In this thesis I summarize the present knowledge about the mechanisms of actions on fungi. I gradually deal with effects of essential oils on cell wall, plasma membrane, mitochondrion, nucleus, quorum sensing, virulence factors, mycotoxin production and fungal development. Generally essential oils do not act on one structure but affect multiple structures and processes at the same time. In the last chapter I mention possible directions for further research of these substances.

Key words: essential oils, fungi, antifungal activity, mechanism of action, mode of action

Obsah

1	Úvod	1
2	Buněčná stěna.....	3
3	Plazmatická membrána	4
3.1	Poškození dráhy v syntéze ergosterolu.....	4
3.2	Narušení homeostázy a struktury	5
3.3	Ovlivnění efluxních pump	7
3.4	Dysfunkce H ⁺ ATPas.....	7
4	Mitochondrie	8
4.1	ROS	9
4.1.1	Tvorba ROS v houbě.....	9
4.1.2	Antioxidační aktivita	10
5	Jádro	11
6	Další buněčné procesy.....	12
7	Quorum sensing.....	13
8	Virulenční faktory	13
8.1	Inhibice produkce enzymů a dalších látek klíčových pro patogenezi	13
8.2	Snížení tvorby biofilmů	15
9	Mykotoxiny	16
10	Vývoj houby.....	17
11	Závěr.....	19
12	Reference.....	21

Seznam použitých zkratk

EO – esenciální olej

ROS – reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku

MIC – minimální inhibiční koncentrace

NO – oxid dusnatý

SEM – skenovací elektronový mikroskop

1 Úvod

Esenciální oleje (EO) jsou těkavé látky z rostlin popsané přibližně v 60 čeledích (Raut & Karuppayil 2014; Saad et al. 2013). EO mohou být syntetizovány ve všech rostlinných orgánech (např. v listech, květech, kořenech nebo plodech) a jsou skladovány např. v žláznatých trichomech, pokožkových buňkách nebo mezibuněčných prostorách (Bakkali et al. 2008). Každý EO zahrnuje komplex okolo 20 – 60 různých sloučenin (Swamy et al. 2016). Jedná se o terpeny, terpenoidy, aromatické sloučeniny odvozené od fenolu a alifatické sloučeniny (Bakkali et al. 2008). V některých případech mohou zahrnovat rovněž mastné kyseliny, oxidy a deriváty síry (Saad et al. 2013). Jde o směsi, které jsou charakterizovány 2–3 hlavními sloučeninami, které se vyskytují ve vysokých koncentracích (20–70 %) a jsou většinou zodpovědné za biologickou aktivitu EO (Bakkali et al. 2008).

Nicméně i minoritní sloučeniny EO mohou hrát podstatnou roli v biologické aktivitě (Lis-Balchin et al. 1998). Dokazuje to např. výzkum EO ze šalvěje *Salvia officinalis*. Bakteriostatický efekt tohoto EO nebyl vysvětlen přítomností jeho hlavních komponent, nýbrž menšinových sloučenin působících pravděpodobně synergicky s hlavními sloučeninami (Marino et al. 2001). Totéž bylo pozorováno u EO z různých druhů tymiánu (*Thymus* sp.) a dobromysli (*Origanum* sp.) při aplikaci na rozličné druhy hub rodu *Aspergillus*. Všechny složky EO dohromady inhibovaly růst těchto hub více než samotné jejich majoritní sloučeniny thymol a karvakrol (Paster et al. 2016).

Chemické složení a obsah EO v rostlině se liší mezi jednotlivými druhy (Miguel et al. 2004) i mezi rostlinami stejného druhu (Mahboubi & Kazempour 2015) a jsou ovlivněny mnoha faktory. Záleží např. na klimatu, znečištění prostředí, složení půdy, době sběru rostliny a jejím stáří, intenzitě slunečního záření nebo na tom, jestli je rostlina vystavena nějakému stresu (Figueiredo et al. 2008).

Komerčně dostupné EO pocházejí zejména z těchto čeledí: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Cupressaceae*, *Pinaceae*, *Myrtaceae* a *Zingiberaceae* (Pauli 2006). Některé rostliny, ze kterých se EO často získávají, jsou zobrazeny na obr. 1 (str. 2). Esenciální oleje mají široké spektrum účinků. Jelikož je rostlina syntetizuje z důvodu své ochrany proti herbivorům, nacházejí své uplatnění jako pesticidy (Koul et al. 2008). Brání rovněž kontaminaci potravin (Sivakumar & Bautista-Baños 2014). Nicméně jejich využití jako konzervanty je omezeno tím, že tyto látky jsou působením tlaku, světla, tepla a kyslíku snadno degradovány (Mohammadi et al. 2015). Díky svým protizánětlivým, antimutagenním, antioxidačním, antidiabetickým, antivirovým, antifungálním, antibakteriálním a antiprotozoálním aktivitám jsou perspektivní pro široké uplatnění v medicíně (Raut & Karuppayil 2014). Zvažuje se jejich využití v prevenci a léčbě rakoviny, kardiovaskulárních onemocněních včetně aterosklerózy a trombózy (Edris 2007).

Kombinace EO z různých rostlin může mít rozdílný efekt na houby. Mohou k sobě působit synergicky, antagonisticky nebo se vzájemně neovlivňovat (Stević et al. 2014). Příkladem synergického působení jsou EO z kajeputu *Melaleuca alternifolia* a levandule *Lavandula angustifolia*, jež inhibovaly růst kultur dermatofyt při nižších koncentracích, než když byly aplikovány jednotlivě (Cassella et al. 2002). Antagonistický účinek měly k sobě naopak EO z hřebíčkovce *Syzygium aromaticum* a rozmarýnu *Rosmarinus officinalis* na *Aspergillus niger* (Fu et al. 2007). Vzájemně se např. neovlivňovaly EO z dobromysli *Origanum vulgare* a levandule *Lavandula angustifolia* aplikované na *Aspergillus flavus*. Nicméně tyto dva EO na *Fusarium semitectum* měly synergický efekt (Stević et al. 2014).

Poněvadž stále narůstá rezistence patogenních hub k antimykotikům (von Lilienfeld-Toal et al. 2019), je nalezení nových antifungálních látek pro léčbu mykotických infekcí velice důležité. EO skýtají dobrý potenciál pro léčbu těchto onemocnění. Nicméně chybí dostatečné informace o jejich farmakologických vlastnostech a vedlejších účincích (Budzyńska et al. 2014). Existuje mnoho studií, které sledovaly antifungální aktivitu EO. Řada mechanismů účinků byla prozkoumána i na molekulární úrovni, avšak stále chybí dostatečné informace o jejich působení (Kedia et al. 2016; Soylu et al. 2006; Tatsadjieu et al. 2009). Jejich objasnění je nezbytné pro budoucí využití EO v klinické praxi. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla věnovat se tomuto tématu ve své bakalářské práci.

Cílem této práce je ilustrovat možné mechanismy působení EO na houby. Jednotlivé mechanismy jsou podloženy konkrétními příklady. Většina EO má vliv na více struktur nebo procesů v buňce. Působí např. na buněčnou stěnu, membránu, mitochondrii nebo jádro, a také na quorum sensing, virulenční faktory, produkci mykotoxinů, či klíčení. Uvedeným tématům se postupně věnuji v následujících kapitolách. Původně jsem se chtěla zaměřit pouze na patogenní houby. Některé mechanismy však nebyly na těchto houbách dosud zkoumány, a proto zahrnuji účinky EO i na modelových druzích nepatogenních zástupců.

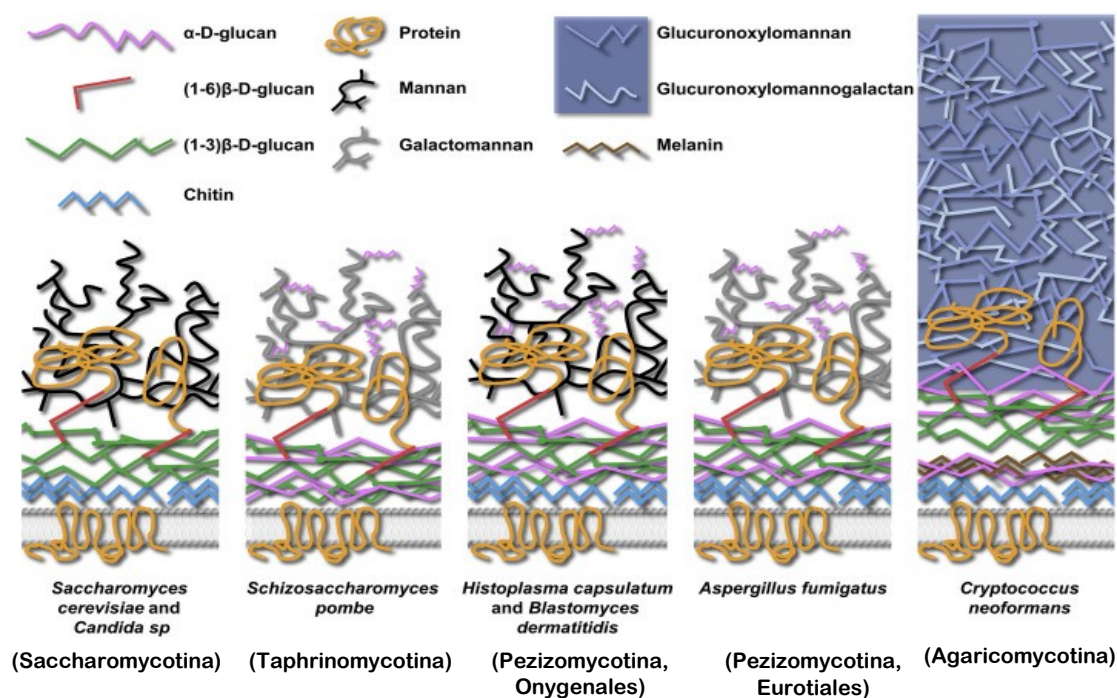
V bakalářské práci používám pojmy antimykotikum a antifungální látka. Antimykotikem rozumím léčivo využívané pro léčbu onemocnění způsobených houbami, antifungální látkou pak vyjadřuji jakoukoliv sloučeninu či směs sloučenin, které působí negativně na houby. Vědecké názvy rostlin jsem sjednotila podle databáze rostlin The Plant List (<http://www.theplantlist.org/> stav únor-květen 2019), české jsou z encyklopedie BioLib (<https://www.biolib.cz/cz/> stav únor-květen 2019).



Obr. 1: Některé významné rostliny využívané pro extrakci esenciálních olejů A) skořicovník (*Cinnamomum verum*); B) tymián (*Thymus broussonetii*); C) rozmarýn (*Rosmarinus officinalis*); D) dobromysl (*Origanum vulgare*); E) hřebíčkovce (*Syzygium aromaticum*); F) pelyněk (*Artemisa arborescens*); G) kmín (*Carum carvi*); H) voňatka (*Cymbopogon citratus*); I) šalvěj (*Salvia officinalis*). Převzato z Akhtar et al. (2014).

2 Buněčná stěna

Buněčná stěna hub tvoří mechanickou bariéru, utváří tvar buňky, zajišťuje mezibuněčnou komunikaci a též chrání buňku před osmotickým stresem (El-Enshasy 2007; Hara et al. 2005). Složení buněčné stěny se liší dle příslušnosti k jednotlivým taxonomickým skupinám (obr. 2). Skládá se z různých polysacharidů, na něž se váží kratší sacharidové řetězce a glykoproteiny (Free 2013). Hlavní strukturní složkou buněčné stěny většiny hub jsou β -1,3-glukany (Moore et al. 2013). Na syntézu těchto sloučenin cílí mnohá antimykotika, např. echinokandiny (Cortés et al. 2019).



Obr. 2: Struktura a složení buněčné stěny u různých druhů hub. Převzato a upraveno podle Cortés et al. (2019).

Podobně jako některá klasická antimykotika, mohou i EO působit na buněčnou stěnu. Ze sloučenin obsažených v EO a působících na β -1,3-glukany lze zmínit např. trans-cinnamaldehyd, který se váže na enzym β -1,3-glukansynthasu, mění jeho konformaci a znemožňuje tak vazbu substrátu (nekompetitivní inhibice) (Bang et al. 2005). Inhibice tohoto enzymu byla pozorována také působením citralu na *Penicillium digitatum* (OuYang et al. 2016). Narušení syntézy glukanu bylo pozorováno i u eugenolu (který je součástí EO z vavřínu *Laurus nobilis* a hřebíčkovce *Syzygium aromaticum*), avšak ne na houbách, nýbrž na buněčné stěně bakterie *Streptococcus sobrinus* (Li et al. 2012). Je známo, že eugenol inhibuje růst hub (např. *Candida albicans*) (He et al. 2007), a proto by bylo zajímavé zjistit, zda eugenol bude potlačovat syntézu glukanu i u hub.

Chitin tvoří 1–15 % obsahu buněčné stěny. V kvasinkách je zastoupen většinou zhruba 1–2 %, u vláknitých hub pak až 15 %. Pro jeho syntézu jsou nutné chitinsynthasy (Free 2013). V *Aspergillus fumigatus* bylo identifikováno nejméně šest genů kódujících chitinsynthasu a pravděpodobně každý z nich hraje roli v různých stádiích vývoje houby (Moore et al. 2013). Poněvadž je chitin stěžejní sloučeninou buněčné stěny patogenních hub, je cílení na jeho syntézu vhodné pro vývoj nových antifungálních látek (Free 2013).

Z těchto antifungálních látek lze zmínit např. anethol, který je součástí EO z anýzu *Pimpinella anisum* a který inhiboval chitinsynthasu tím, že se vázal na komplex enzym-substrát

(akompetitivní inhibice) (Yutani et al. 2011). Stejný efekt je znám i u působení citralu na *Penicillium digitatum* (OuYang et al. 2016) a trans-cinnamaldehydu, který je hlavní sloučeninou EO ze skořicovníku *Cinnamomum osmophloeum* (Bang et al. 2005). Při aplikaci EO z blahovičnicku *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na fytopatogenní houbu *Magnaporthe grisea* došlo k snížení exprese genu kódujícího chitindeacetylasy, která rozkládá chitin, a tím byla narušena rovnováha složení buněčné stěny (Zhou et al. 2016).

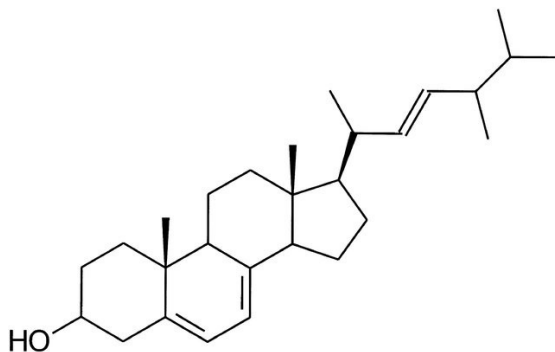
Cílení na buněčnou stěnu není ale charakteristické pro všechny EO. Např. karvakrol, který je důležitou složkou mnoha EO jako dobromysli (*Origanum* sp.), tymiánu (*Thymus* sp.), saturejky (*Satureja* sp.) nebo lipie (*Lippia* sp.), interaguje s buněčnou membránou, ale buněčnou stěnu pravděpodobně nijak neovlivňuje (Lima et al. 2013). Parveen et al. (2004) pozorovali zvýšení exprese chitinsynthasy a β -1,3-glukansynthasy u *Saccharomyces cerevisiae* při aplikaci α -terpinenu, který je součástí EO z kajeputu *Melaleuca alternifolia*, dobromysli (*Origanum* sp.) nebo kardamovnicku *Elettaria cardamomum*. Buňka houby zvýšenou produkcí chitinu a β -1,3-glukanu kompenzovala negativní účinek této sloučeniny.

Poškození buněčné stěny bylo rovněž pozorováno vlivem mnoha EO, u kterých ale nebyl zkoumán přesný mechanismus účinku. Docházelo nejčastěji ke ztenčení stěny, narušení její integrity a oddělení od plazmatické membrány (Nakamura et al. 2004; Nogueira et al. 2010; Rasooli & Owlia 2005; Rasooli et al. 2006).

3 Plazmatická membrána

3.1 Poškození dráhy v syntéze ergosterolu

Ergosterol je důležitou součástí plazmatické membrány hub. Hraje roli v růstu hyfy, je zodpovědný za správnou fluiditu a integritu membrány a správnou funkci membránových enzymů (např. proteinů účastnících se syntézy chitinu). Narušení jeho syntézy způsobuje osmotickou nestabilitu (Khan et al. 2010; Lupetti et al. 2002). Struktura ergosterolu (obr. 3) je podobná cholesterolu, který se nachází v savčích buňkách (Vanden Bossche et al. 1995). Na rozdíl od cholesterolu, jenž má sigmoidní tvar, má molekula ergosterolu cylindrickou trojrozměrnou strukturu. Tento rozdíl konformace je významný pro účinnost některých antifungálních látek, např. amfotericinu B, který se díky tomu váže na ergosterol mnohonásobně více než na cholesterol (Odds et al. 2003).



Obr. 3: Struktura ergosterolu

Kromě již zmíněného amfotericinu B na dráhu syntézy ergosterolu cílí další antimykotika jako např. azoly, allylaminy nebo fenylnmorfoliny (Odds et al. 2003). Syntézu ergosterolu mohou rovněž narušovat EO (Ahmad et al. 2011b; Hua et al. 2014; Pinto et al. 2006; Rajput & Karuppayil 2013). Obecně platí, že při vyšší koncentraci EO produkce ergosterolu klesá (Ahmad et al. 2011a,b; Tian et al. 2012b).

Příkladem EO, který způsobil úbytek ergosterolu, je EO z kopru *Anethum graveolens*, který narušil syntézu ergosterolu v membráně houby *Aspergillus flavus*. Za jeho antifungální aktivitu zodpovídají pravděpodobně jeho majoritní složky, a to karvon (41,5 %), limonen (32,6 %) a apiol (16,8 %) (Tian et al. 2012a). Snížení obsahu ergosterolu bylo na *A. flavus* rovněž pozorováno účinkem EO ze skořicovníku *Cinnamomum jensenianum* (Tian et al. 2012b).

Ahmad et al. (2011a) ve své studii navrhovali, že mechanismus účinku karvakrolu a thymolu, které jsou součástí EO z tymiánu (*Thymus* sp.), může být podobný antitymolytickému flukonazolu. Azoly totiž obecně inhibují 14 α -demethylaci lanosterolu, jednoho z prekurzorů ergosterolu, a tím zamezují jeho vzniku (Sud & Feingold 1981; Vanden Bossche et al. 1995). Na rozdíl od flukonazolu, který vykazuje fungistatické účinky, však mají karvakrol a thymol i fungicidní aktivitu (Ahmad et al. 2011a).

Karvakrol potlačoval v *Candida albicans* expresi dvou genů kódujících klíčové enzymy v syntéze ergosterolu (Alizadeh et al. 2018; Zhou et al. 2018b). Jeden z nich kóduje enzym katalyzující tvorbu dvojné vazby v cyklu B episterolu (Morio et al. 2012), druhý je zodpovědný za tvorbu lanosterol 14-demethylasy, jež přeměňuje lanosterol na ergosterol (Alizadeh et al. 2018). Oba geny navíc hrají důležitou roli ve virulenci této kvasinky (Akins 2005), jelikož představují dva z pěti hlavních genů zodpovědných za resistenci k antitymolytickým (Zhou et al. 2018b).

Expresi genů důležitých pro syntézu ergosterolu snižuje též citral, který je hlavní složkou např. EO z voňatky *Cymbopogon citratus* nebo myrtovníku *Backhousia citriodora*. U *Penicillium digitatum* byla zjištěna snížená exprese genů kódujících desaturasy, demethylasy, transferasy a synthasy (OuYang et al. 2016). Účinek citralu je tedy komplexní – ovlivňuje jak membránu, tak buněčnou stěnu.

3.2 Narušení homeostázy a struktury

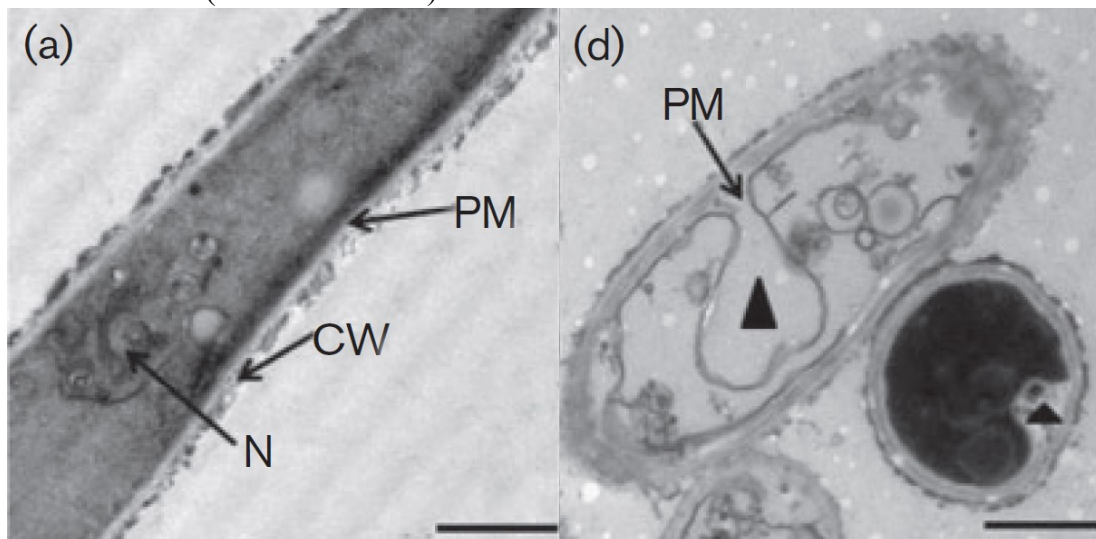
Účinek EO na membrány houbových hyf (potažmo kvasinkových buněk) se neprojevuje jen při syntéze jednotlivých komponent, ale EO způsobují i morfologické změny na membráně (Tolouee et al. 2010). EO z tymiánu (*Thymus* sp.) při působení na *Aspergillus parasiticus* zapříčinil, že se membrána oddělila od buněčné stěny, tvořily se invaginace a lomasomy¹ (Rasooli & Owlia 2005). Nogueira et al. (2010) popsali, že membrána účinkem EO z nestařce *Ageratum conyzoides* ztratila svou hladkou strukturu a změnila se v drsnou a klkovitou s invaginacemi. Působením EO z fenyklu *Foeniculum vulgare* se membrána stala rovněž nepravidelnou s invaginacemi (obr. 4) (Zeng et al. 2015).

Esenciální oleje mohou ovlivňovat i fluiditu membrány. Některé komponenty EO (např. terpenoidní fenoly) mohou díky své hydrofobní povaze prostupovat membránou a měnit tak její vlastnosti (Rao et al. 2010). Např. geraniol, který je obsažen mimo jiné v EO z voňatky *Cymbopogon martini*, po včlenění do membrány zvyšoval její fluiditu, což vedlo k narušení homeostázy buňky (Bard et al. 1988).

Působením EO může dojít rovněž ke změně složení membrány – snižuje se celkové množství lipidů a sterolů a zvyšuje se množství fosfolipidů (Ghfir et al. 1994). Toto bylo zkoumáno na dvou druzích voňatky (*Cymbopogon citratus*, *C. martini*) a merlíku *Chenopodium ambrosioides*. Při aplikaci EO z těchto rostlin na membrány různých hub byla pozorována změna podílu nasycených mastných kyselin vůči nenasyceným mastným kyselinám

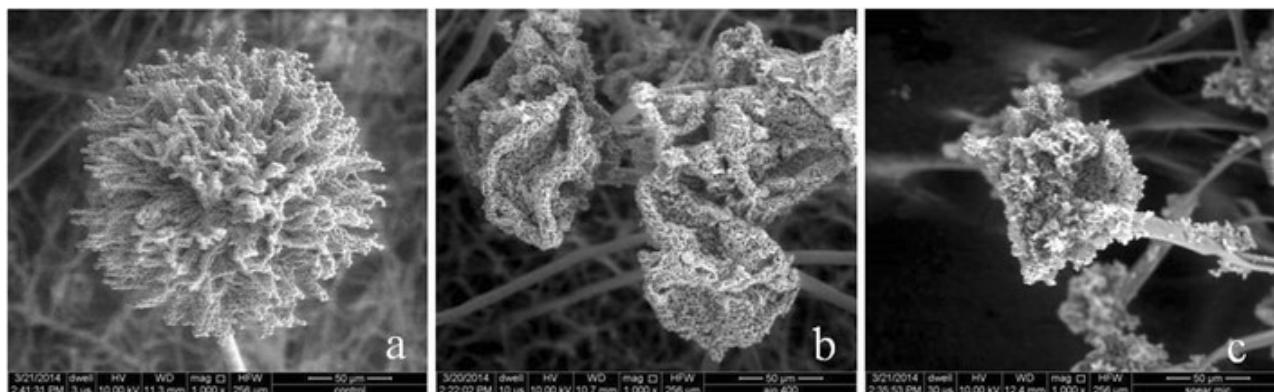
¹ jako lomasomy jsou označovány váčky tvořené mezi membránou a buněčnou stěnou (Scott et al. 1986)

ve prospěch nasycených (Chekem et al. 2010; Helal et al. 2007; Prashar et al. 2003). U EO z *Chenopodium ambrosioides* byla změna podílu nasycených a nenasycených mastných kyselin spojená s přeměnou osmnáctiuhlíkatých mastných kyselin (kyseliny olejové a linolové) na šestnáctiuhlíkaté mastné kyseliny (kyselinu palmitovou) vázaných ve fosfolipidech (Chekem et al. 2010). Pokus byl také prováděn na EO z yzopu *Hyssopus officinalis*. Zde však zvýšení podílu nasycených vůči nenasyceným mastným kyselinám pozorováno nebylo. Působením tohoto oleje se v membráně naopak 4,7x zvýšil obsah kyseliny linolenové a množství kyseliny stearové bylo sníženo o 40 % (Ghfir et al. 1994).



Obr. 4: Ultrastruktura *Trichophyton rubrum* po ošetření 0,078 µl/ml EO z *Foeniculum vulgare* v transmisním elektronovém mikroskopu (d), (a) – kontrola, PM – plazmatická membrána, CW – buněčná stěna, N – jádro. Převzato a upraveno podle Zeng et al. (2015).

S vlivem na složení membrány souvisí i schopnost EO narušovat propustnost membrány pro ionty. Např. EO z máty *Mentha spicata* způsobil u *Aspergillus flavus* nerovnováhu Ca^{2+} , K^+ a Mg^{2+} . Množství prošlého K^+ bylo větší než zbylých kationtů. Výsledkem byly deformované hyfy se zploštělými konidiemi, které měly nerovnosti na svém povrchu (obr. 5) (Kedia et al. 2016). Změna hladiny kationtů – Ca^{2+} , K^+ a Mg^{2+} u *Aspergillus flavus* byla zjištěna též při použití EO z voňatky *Cymbopogon citratus*. Zde však bylo pozorováno největší zvýšení hladiny u Mg^{2+} (Helal et al. 2007).



Obr. 5: Efekt EO z *Mentha spicata* na morfologii *Apergillus flavus* (a – kontrola, b – po ošetření 0,5 µl/ml EO, c – po ošetření 1,0 µl/ml EO). Převzato z Kedia et al. (2016).

Prashar et al. (2003) sledovali změnu propustnosti K^+ a Mg^{2+} působením EO z voňatky *Cymbopogon martini* a jeho majoritní složky geraniolu na *Saccharomyces*

cerevisiae. Nepozorovali však změnu propustnosti membrány pro Ca^{2+} . Geranylacetát, který je druhou nejzastoupenější složkou (cca 20 %) tohoto EO, změnu propustnosti K^+ a Mg^{2+} neindukoval (Prashar et al. 2003).

Rozdíl koncentrací K^+ uvnitř a vně buňky narušuje dále karvakrol (Rao et al. 2010). Draselný kation je nejběžnější kation v cytoplasmě kvasinek (kolem 150 mM) a hraje důležitou roli např. v udržování turgoru nebo syntéze proteinů (Prashar et al. 2003). Delokalizace elektronů v karvakrolu umožňuje disociaci H^+ z hydroxylové skupiny. Toto dovoluje karvakrolu transportovat kationty jako H^+ nebo K^+ skrz membránu, což narušuje pH uvnitř buňky (Prasad et al. 2010).

Karvakrol má i další účinky. Způsobuje zvýšení hladiny vápenatých iontů v cytoplasmě, čímž pravděpodobně zapříčiňuje buněčnou smrt. U *Saccharomyces cerevisiae* bylo pozorováno, že karvakrol vyvolal v buňce transkripční změny. Byly blízké těm, jež se dějí při vápníkové stresové odpovědi. Navíc se tyto změny podobaly odpovědi na rapamycin, který je inhibítoem TOR dráhy (z angl. target of rapamycin pathway). Tato dráha kontroluje buněčný růst v závislosti na živinách a stresu regulováním mRNA transkripce, biogeneze ribozomů, translace proteinů, autofagie a transportu živin. Karvakrol může ovlivňovat TOR dráhu nezávisle nebo přes vápenaté ionty (Rao et al. 2010).

3.3 Ovlivnění efluxních pump

Esenciální oleje rovněž ovlivňují efluxní pumpy, které jsou přítomné na plazmatické membráně. Tyto pumpy transportují toxické látky ven z buňky (Kang et al. 2010). Pokud dojde k jejich zvýšené expresi, jsou zodpovědné za rezistenci k antimykotikům (Morace et al. 2014).

Thymol a karvakrol snížily u různých izolátů *Candida* expresi dvou genů, které kódují efluxní pumpy, čímž přispívají k rezistenci k flukonazolu. Tyto monoterpeny inhibovaly eflux až k 70–90 %. Je možné je využít k zvýšení efektu flukonazolu, protože k němu působí synergicky (Ahmad et al. 2013).

Efluxní pumpy na *Candida albicans* pozorovali Sharma & Prasad (2011). Došli k závěru, že k mnohočetné rezistenci *Candida albicans* přispívá jeden protein efluxní pumpy patřící mezi ABC transportéry.² Eflux látek ABC transportéry u *Candida albicans* byl modulován farnesolem, který takto zabraňoval úniku látek, např. flukonazolu, ven z buňky (Sharma & Prasad 2011). Farnesol je quorum-sensing molekula, která je produkována samotnou houbou. Je součástí i mnoha EO, např. voňatky *Cymbopogon martini*, máty *Mentha piperita*, pelargonie *Pelargonium graveolens* nebo rozmarýnu *Rosmarinus officinalis* (Padder et al. 2018). Viz kapitola 7.

3.4 Dysfunkce H^+ ATPas

EO mohou působit inhibici H^+ ATPasy, která u kvasinky udržuje na plazmatické membráně elektrochemický protonový gradient, jenž je důležitý pro kotransport živin, růst buňky, reguluje intracelulární pH a má roli v patogenitě hub efektem na dimorfismus, příjem živin a acidifikaci média (Manzoor et al. 2002; Seto-Young et al. 1997). H^+ ATPasu ovlivňuje mnoho sloučenin, aktivuje ji např. glukóza (Serrano 1983).

Bhatia et al. (2012) na různých izolátech zástupců rodu *Candida* ukázali, že H^+ ATPasu inhibovaly isoeugenol (součástí EO z vavřínu *Laurus nobilis*) a o-methoxycinnamaldehyd (přítomný v EO ze skořicovníku *Cinnamomum* sp.). H^+ ATPasu u izolátů zástupců rodu

² ABC transportéry jsou transmembránové proteiny, přenášející látky přes membránu za spotřeby ATP

Candida, jak citlivých, tak rezistentních k flukonazolu, inhibovaly rovněž thymol a eugenol. Je možné, že eugenol a thymol interagují s H^+ ATPasou přímo, protože narušení membrány, které je způsobeno úbytkem sterolů aplikací antimykotik jako amfotericinu B nebo flukonazolu, nemění aktivitu tohoto enzymu (Ahmad et al. 2010).

Snížení ATPasové aktivity na plazmatické membráně dále způsobil např. EO z máty *Mentha piperita* a jeho hlavní složky karvon, menthol a menthon. Je možné, že tyto sloučeniny působí na ATPasu přímo, ale k doložení by bylo potřeba provést výzkum s čistým enzymem (Samber et al. 2015).

Funkce ATPasy může být ale narušena i nepřímo, a to nedostatkem ATP, např. z důvodu poškození mitochondrie. O tomto účinku uvažovali Hammer et al. (2004) při výzkumech působení EO z kajeputu *Melaleuca alternifolia* na *Candida albicans* a *C. glabrata*.

4 Mitochondrie

Esenciální oleje mohou působit na mitochondrie a snižovat efektivitu buněčného dýchání úbytkem mitochondrií nebo narušením jejich struktury, např. redukcí krist nebo invaginací mitochondriální membrány (Nogueira et al. 2010).

Jedním ze způsobů, jak EO narušují mitochondrii, je inhibice mitochondriálních dehydrogenas jako např. laktátdehydrogenasy, malátdehydrogenasy nebo sukcinátdehydrogenasy. Tyto mitochondriální dehydrogenasy se účastní biosyntézy ATP, které je důležité pro normální činnost buňky tím, že umožňuje krátkodobé uchování energie v buňkách (Chen et al. 2013; Hu et al. 2017).

Některé EO mohou v mitochondriích inhibovat elektronový transport, a tak snižovat mitochondriální membránový potenciál. Buňka houby se pak snaží stávající potenciál zachovat. Např. EO z ločidlovky (metlovky) *Ferulago lutea* snížil aktivitu reduktas v mitochondrii kvasinky *Candida albicans*. Kvasinka pravděpodobně reagovala na toto poškození regulací membránového potenciálu dvěma rozdílnými mechanismy, které závisely na dávce EO. Při nízké koncentraci EO (od MIC/16 do MIC/512), došlo ke změně permeability mitochondriální membrány pro vápenaté ionty. Při vysoké koncentraci EO (od 2MIC do MIC/8) se naopak tvořily anti-apoptotické proteiny, které blokovaly buněčnou smrt tím, že redukovaly oxidativní stres (Pinto et al. 2013).

Esenciální oleje mohou dále narušit aktivitu mitochondriálních ATPas, což vede ke snížení množství ATP a následně k buněčné smrti. Navíc následkem inhibice mitochondriální ATPasy dochází i k poklesu aktivity ATPas na plazmatické membráně, a to pak vede ke změně membránového potenciálu a narušení plazmatické membrány. Takto např. funguje EO z kurkumy *Curcuma longa* na *Aspergillus flavus*, který inhibuje i malátdehydrogenasu a sukcinátdehydrogenasu (Hu et al. 2017).

Jednou z dalších možností, jak EO zapříčiňují smrt buňky, je zvýšení množství intracelulárních vápenatých iontů a produkce ROS v mitochondrii. To pak zapříčiňuje depolarizaci membrány mitochondrie a následně vylití cytochromu c a aktivaci enzymů v signální kaskádě vedoucí k apoptóze. Toto pozorovali Tian et al. (2017) na *Candida albicans* při aplikaci monoterpenového alkoholu nerolu, který je součástí některých EO (např. voňatky – *Cymbopogon* sp.).

Vliv EO na mitochondrie hub byl studován i u mnoha jiných EO (Chen et al. 2013; Hammer et al. 2004; Nogueira et al. 2010; Rasooli et al. 2006; Shao et al. 2013; Tian et al.

2012a, 2014; Zeng et al. 2015). U těchto olejů však nebyl přesný mechanismus jejich působení objasněn.

4.1 ROS

S činností mitochondrií jsou úzce spjaty reaktivní formy kyslíku (ROS), neboť mitochondrie jsou jejich hlavním zdrojem (Lesnefsky et al. 2001). Jsou to toxické silně reaktivní sloučeniny vzniklé jako vedlejší produkty aerobního metabolismu. Jsou odstraňovány antioxidanty a antioxidačními enzymy (Bailey-Serres & Mittler 2006). V mitochondriích jsou produkovány superoxidové anionty a peroxid vodíku, které reagují s železnatými ionty a generují tak reaktivní intermediáty jako hydroxylový radikál, který značně poškozuje mitochondriální DNA. Následkem toho dochází ke snížené expresi proteinů důležitých pro transport elektronů, narušuje se membránový potenciál, ATP syntéza, a to všechno vede k buněčné smrti (Van Houten et al. 2006).

ROS ovlivňují v buňce různé procesy. Působí inaktivaci některých enzymů – např. pyruvátdehydrogenasy (Tabatabaie et al. 1996). Dále hrají roli v signálních kaskádách, mohou indukovat genovou expresi, ovlivňovat buněčné dělení a jsou důležité v obraně proti patogenům (Hancock et al. 2001; Takemoto et al. 2007).

Esenciální oleje, pokud jde o jejich vliv na ROS, mohou při obraně proti houbovým patogenům působit na různých úrovních. Mohou vyvolávat tvorbu ROS v houbě (Tian et al. 2012a) nebo působit jako antioxidanty a chránit tak rostlinu před ROS produkovánými houbou (Tepe et al. 2004).

4.1.1 Tvorba ROS v houbě

Některé EO způsobují tvorbu ROS v hyfách houby, a tím vedou k její smrti (Cotoras et al. 2013; Shen et al. 2016; Tian et al. 2012a). Mnohdy jsou za tuto aktivitu zodpovědné terpenoidy, které mohou narušovat integritu membrány, a tím vést ke zvýšení tvorby ROS v houbě (Haque et al. 2016).

Např. EO z kopru *Anethum graveolens* způsobil akumulaci ROS v *Aspergillus flavus*. Ta byla zapříčiněna sníženou ATPasovou a dehydrogenasovou aktivitou. Ty vedly k dysfunkci mitochondrie, kde se pak hromadily volné kyslíkové radikály, které zapříčinily buněčnou smrt. Za tuto aktivitu mohly být zodpovědné majoritní sloučeniny tohoto EO, a to karvon (41,5 %), limonen (32,6 %) a apiol (16,8 %) (Tian et al. 2012a).

Dalším příkladem je akumulace ROS v houbě *Botrytis cinerea*. Po ošetření farnesolem došlo vlivem ROS k apoptóze (Cotoras et al. 2013). K apoptóze došlo nejen akumulací ROS, ale také k tomu přispěla DNA fragmentace a externalizace fosfatidylserinu (Cotoras et al. 2013). Generování ROS je závislé na mitochondriálním membránovém potenciálu, který je zajištěn F_0F_1 -ATPasou hydrolyzující ATP. U *Saccharomyces cerevisiae* se zjistilo, že farnesol urychluje tuto hydrolýzu (Machida & Tanaka 1999).

Fungicidní aktivitu, kde hrají důležitou roli ROS, může mít též thymol, který je součástí EO tymiánu (*Thymus* sp.) i jiných druhů z čeledi *Lamiaceae*, např. dobromysli (*Origanum* sp.). Thymol indukuje ve sporách *Aspergillus flavus* tvorbu ROS a ty jsou pak zodpovědné za vznik NO, který působí smrt buňky. Jakým přesným mechanismem NO zabíjí houbu, není známo (Shen et al. 2016). Nicméně se ví, že signální kaskáda NO zapříchující buněčnou smrt vyvolává S-nitrosylaci glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPDH), která vede k vazbě a stabilizaci mediátoru apoptózy Siah1 (Hara et al. 2005). Ve sporách *A. flavus* byl GAPDH sice identifikován, což přispívá k domněnce, že by na něj mohlo cílit NO, avšak NO samotné

nemůže inhibovat růst *A. flavus*. K jeho inhibici je totiž nutný thymol, a tak v dráze budou hrát roli pravděpodobně i další sloučeniny (Shen et al. 2016).

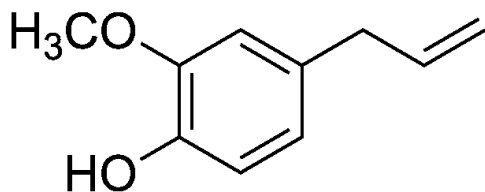
4.1.2 Antioxidační aktivita

ROS mohou produkovat i parazitické houby, a tak poškozovat rostlinná pletiva a živočišné tkáně. Např. tvorbu ROS zvyšují aflatoxiny, látky produkované druhy rodu *Aspergillus* (Alpsoy 2010). K obraně proti těmto patogenům rostlina vytváří EO, které mají schopnost vychytávat volné radikály a zabraňovat tak oxidativnímu stresu (Ray et al. 2012). Nicméně ne všechny EO mají tento účinek. Některé mohou být totiž dokonce prooxidativní – např. tím, že některé fenolické sloučeniny EO jsou kontaktem s ROS oxidovány a produkují fenoxylvé radikály, znásobují tak i množství škodlivých radikálů (Bakkali et al. 2008).

Antioxidační účinky EO závisí na chemickém složení rostliny (Miguel et al. 2004). Korelují s přítomností fenolické skupiny (Mansouri et al. 2005), ale její přítomnost pro antioxidační aktivitu není nezbytně nutná (Miguel et al. 2004). K vychytávání radikálů přispívají také ketony, aldehydy, uhlovodíky, ethery, monoterpeny nebo alkoholy (Razzaghi-Abyaneh & Rai 2013; Ruberto & Baratta 2000).

Jedním z mechanismů antioxidačních účinků je inhibice prooxidativních enzymů. Příkladem může být EO z prorostlíku *Bupleurum marginatum*, který mimo jiné inhiboval i lipoxygenasu. Tento enzym, důležitý pro tvorbu protizánětlivých mediátorů leukotrienů, jako meziprodukt tvoří velmi reaktivní superoxid, který je však ve velkém množství škodlivý (Ashour et al. 2009).

Antioxidační aktivitu nebo aktivitu vychytávání jiných než kyslíkových radikálů (angl. scavenging activity) má mnoho EO z rostlin běžně využívaných v kuchyni. Např. skořice (skořicovník) *Cinnamomum zeylanicum*, muškátový oříšek (muškátovník) *Myristica fragrans*, tymián *Thymus vulgaris*, hřebíček (hřebíčkovec) *Syzygium aromaticum*, bazalka *Ocimum basilicum*, oregano (dobromysl) *Origanum floribundum* (Tomaino et al. 2005). Z těchto rostlin nejefektivněji vychytávají radikály EO ze skořice a hřebíčku, které obsahují eugenol. Eugenol (obr. 6) má fenolickou skupinu a v ortho poloze od ní pak methoxy skupinu, což je elektron odpuzující skupina. Tento strukturní znak je zodpovědný za silné vychytávání radikálů (Dorman et al. 2000; Tomaino et al. 2005).



Obr. 6: Struktura eugenolu

Oxidativní stres může snižovat též EO ze *Zataria multiflora*, který vychytává jak kyslíkové, tak dusíkové radikály. Sloučeniny karvakrol a thymol, které jsou v oleji obsaženy z 29,2 % a 25,4 %, snižují hladinu NO a H₂O₂ několika možnými mechanismy. První z nich je vychytávání kyslíkových a dusíkových radikálů díky redukčním vlastnostem (Kavoosi & Teixeira da Silva 2012). Druhý je pak inhibice NO synthasy (NOS) a NADH oxidasy (NOX), které vedou jinak k oxidativnímu stresu (Choi et al. 2008; Kavoosi & Teixeira da Silva 2012; Yang et al. 2009). Jak přesně funguje tato inhibice, není úplně jasné. Nicméně se ví, že pro aktivitu enzymů NOS a NOX je vyžadováno NADH nebo NADPH, které fungují jako redukční

činidla. Fenolová skupina antioxidantu snižuje hladinu NADH/NADPH tím, že tyto sloučeniny oxiduje na $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (Kavoosi & Teixeira da Silva 2012).

Jednou z metod zjištění antioxidační aktivity je využití DPPH radikálu. DPPH radikál (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) má fialovou barvu, kterou je možno měřit spektrofotometricky. Je zároveň sám o sobě stabilní a v přítomnosti antioxidantů se odbarví (Holtz 2009). DPPH radikál byl velmi dobře vychytáván EO z kurkumy *Curcuma zedoaria*. Množství radikálů se snižovalo lineárně v závislosti na zvyšující se koncentraci oleje (Mau et al. 2003).

Schopnost vychytávat volné radikály mají také EO z máty *Mentha piperita*, *M. longifolia* a *M. aquatica*. Z těchto tří druhů máty DPPH radikál redukovala nejvíce *M. piperita* a to až 50 %. Stejná rostlina vykazovala nejvyšší vychytávání OH radikálu. Kapacita vychytávat volné radikály korelovala s obsahem monoterpenových ketonů (mentonu, isomentonu). *Mentha piperita* zároveň inhibovala dermatofytní houbu *Trichophyton tonsurans* a kvasinku *Candida albicans* s velmi nízkou MIC (4 $\mu\text{l/ml}$). V EO *M. aquatica* byl pravděpodobně nejefektivnější 1,8-cineol (eukalyptol) (Mimica-Dukić et al. 2003). 1,8-cineol se vyskytuje i v dalších EO např. v některých druzích tymiánu *Thymus caespititius*, *T. camphoratus* a *T. mastichina*, kde spolu s linalolem tvořily hlavní obsahové látky těchto olejů (Miguel et al. 2004).

I mnoho dalších olejů vykazovalo tuto aktivitu – např. EO z meduňky *Melissa officinalis*, který mimo jiné vykazoval dobrou inhibiční aktivitu na *Trichophyton* sp. (Ukic et al. 2004), z kajeputu *Melaleuca alternifolia* (Kim et al. 2004), nebo z šalvějí *Salvia absconditiflora* a *S. multicaulis* (Tepe et al. 2004).

5 Jádru

Esenciální oleje mohou působit oxidativní poškození organel v cytosolu (viz kapitola 4). Hromadění ROS může způsobit oxidativní ničení makromolekul, které vede mimo jiné i k destrukci DNA (Tian et al. 2017). Radikálové reakce v některých případech rovněž znemožňují tvorbu kovalentních vazeb k DNA (Bakkali et al. 2008). Nicméně některé EO, zejména ty, které obsahují flavonoidy a fenolické složky, naopak chrání DNA před oxidativním poškozením (Kalim et al. 2010).

Mnoha autory bylo pozorováno, že EO nemají v houbách mutagenní účinky (Gasparetto et al. 2017; Knežević-Vukčević et al. 2009; Vuković-Gačić et al. 2006). Nicméně Bakkali et al. (2005) zjistili, že EO z dobromysli *Origanum compactum*, koriandru *Coriandrum sativum*, pelyňku *Artemisia herba alba*, skořicovníku *Cinnamomum camphora* a smilu *Helichrysum italicum* indukovaly v *Saccharomyces cerevisiae* drobné mutace mimo jadernou DNA. Za těmito mutacemi stojí pravděpodobně poškození mitochondrie, jež se pak dědí do dceřiných buněk. Působením uvedených EO nebyly však způsobovány vážnější mutace v jaderné DNA – indukovaly se totiž geny, které jsou zodpovědné za reparaci DNA. Konkrétně byl indukován gen kódující podjednotku ribonukleotidreduktasy, enzymu, jenž je zahrnut v syntéze prekurzorů pro replikaci a reparaci DNA, a gen důležitý v reparaci dvouřetězcových zlomů DNA (Bakkali et al. 2005).

Z důvodu reparace poškozených funkcí buňky houby může působení některých EO naopak podporovat tvorbu DNA. Bylo to sledováno u EO z koriandru *Coriandrum sativum* při aplikaci na různé kmeny *Candida* (Silva et al. 2011). Jen velmi málo studií pojednává o inhibici syntézy DNA hub esenciálními oleji jiným mechanismem než vlivem ROS. Avšak bylo pozorováno, že po ošetření fytopatogenní houby *Magnaporthe grisea* EO z blahovičnicku

Eucalyptus grandis x *E. urophylla* byla snížena exprese genu kódujícího ribosa-5-fosfátisomerasu, enzymu, který je zahrnut v syntéze nukleotidů (Zhou et al. 2016).

Působením geraniolu na rakovinné buňky lidského střeva byla zjištěna snížená exprese genů, kódujících thymidylátsynthasu a thymidinkinasu. Oba tyto enzymy jsou důležité pro syntézu DNA (Carnesecchi et al. 2004). Thymidylátsynthasa je zásadní pro syntézu purinů, která je stěžejní pro DNA replikaci (Simon et al. 2018). Bylo pozorováno, že struktura tohoto enzymu se lišila mezi člověkem a *Pneumocystis jiroveci*. Proto by bylo nalezení inhibitorů selektivních pro thymidylátsynthasu *P. jiroveci* přínosné pro léčbu pneumocystózy (Anderson et al. 2000). Změnu exprese genů pro DNA replikaci sledovali Li et al. (2016) na kvasince *Candida albicans* působením EO z česneku *Allium sativum*. Zda tento EO inhiboval právě thymidylátsynthasu, není známo. Bylo by však zajímavé zjistit, jestli EO z česneku náhodou nepůsobí právě na tento enzym a zda by tohoto faktu nemohlo být využito pro léčbu pneumocystózy.

6 Další buněčné procesy

Esenciální oleje mohou ovlivňovat mnoho dalších buněčných procesů jako buněčné dělení (Li et al. 2016), metabolismus proteinů a RNA (Zhou et al. 2018a) či buněčný cyklus (Zore et al. 2011).

Naeini & Shokri (2012) navrhli, že mechanismus účinku EO ze šabreje *Cuminum cyminum* na různé kmeny rodu *Aspergillus* by mohl spočívat v narušení mitotického vřeténka (což pak vede ke stimulaci non-disjunkcí) nebo indukci chromosomového zlomu. Shodné mechanismy má možná i EO z řebříčku *Achillea millefolium*, který vykázal rekombinační aktivitu na *Aspergillus nidulans* (Sant'Anna et al. 2009).

Co se týče vlivu EO na syntézu proteinů, bylo pozorováno, že působením dekanalu na *Penicillium expansum* byla potlačena exprese genů zásadních pro translaci, např. genů kódujících některé translační iniciační a elongační faktory, syntézu aminoacyl-tRNA nebo vznik ribozomů (Zhou et al. 2018a). Darvishi et al. (2013a) objevili, že na syntézu a transport aminokyselin má vliv eugenol. Tato sloučenina na cytoplasmatické membráně kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* inhibovala aminokyselinové permeasy.

Jedním z dalších účinků EO je inhibice telomeras. Telomerasy prodlužují telomery, což jsou specifické sekvence na konci chromosomů pomáhající udržovat integritu chromosomů a zabráňující jejich spojování. Bylo pozorováno, že thymol inhiboval expresi genu telomerasové reverzní transkriptasy u *Saccharomyces cerevisiae*. Telomerasová reverzní transkriptasa je katalytickou složkou telomerasy této kvasinky. Poněvadž jsou telomery stěžejní pro životaschopnost buňky, thymol narušením produkce telomeras může urychlovat proces stárnutí, zastavovat buněčný cyklus a spouštět apoptózu (Darvishi et al. 2013b).

Narušení buněčného cyklu působily rovněž některé další terpenoidy. Linalool a linalylacetát u *Candida albicans* zastavily vývoj buňky v G1 fázi, citral a citronelal v S fázi a benzylbenzoát v přechodu mezi G2 a M fází (Zore et al. 2011). U cinnamaldehydu, který je hlavní sloučeninou EO ze skořicovníku *Cinnamomum verum*, byla na různých kmenech *Candida albicans* pozorována depolymerizace tubulinu, což vedlo ke zničení mitotického vřeténka a následně k zastavení buněčného cyklu (Shahina et al. 2018).

Li et al. (2016) pozorovali, že působením EO z česneku *Allium sativum* na *Candida albicans* došlo ke změně exprese téměř 3000 genů. Všechny tyto geny, jejichž exprese se změnila (většinou se snížila), byly zásadní pro přežívání a reprodukci této houby a zahrnovaly

bezpočet různých genů nezbytných pro její správnou funkci. Jednalo se např. o geny pro oxidativní fosforylaci, spliceosom, buněčný cyklus, tvorbu proteinů v endoplazmatickém retikulu a jejich export, metabolismus pyrimidinů, meiózu, transport a degradaci RNA, tvorbu ribozomů, MAPK signální dráhu nebo pro nukleotidovou excizní reparaci. Zvýšená exprese genů po aplikaci česnekového oleje byla sledována např. u pyruvátdekarboxylasy, adenylátkinasy, hexokinasy nebo u heat shock proteinu Ssc1. Zvýšená produkce hexokinasy – enzymu, který je součástí glykolýzy – může být vyvolána zvýšenou potřebou energie buňky houby. Adenylátkinasa je důležitá k udržení homeostázy v buňce. Tvorba heat shock proteinů (proteinů teplotního šoku) je nedílnou součástí odpovědi buňky na stres a houba jejich produkcí spouští obranné mechanismy proti svému poškození (Li et al. 2016).

7 Quorum sensing

Esenciální oleje mohou mít vliv na quorum sensing. Je to mechanismus komunikace mezi mikroorganismy pomocí signálních molekul. Tato signalizace je závislá na hustotě mikroorganismů – se zvyšující se hustotou se zvyšuje počet i signálních molekul, až dojde k prahu, kdy se mění exprese řady genů. Jednotlivé buňky se díky tomuto mechanismu mohou chovat jako mnohobuněčný organismus. Quorum sensing hraje roli v tvorbě biofilmů, morfogenezi a patogenezi (Padder et al. 2018).

Nejnámější quorum sensing molekulou je farnesol. Tato molekula zabraňuje u dimorfních hub přechodu z kvasinkovité fáze do myceliální. Farnesol aplikovaný na biofilm kvasinky *Candida albicans* způsobil snížení exprese genu kódujícího protein důležitý k adhezi kvasinky k epiteliálním buňkám v ústní dutině (Ramage et al. 2002; Williams et al. 2013). Dále farnesol inhiboval signální kaskádu, která vede k formaci hyf (Davis-Hanna et al. 2007). Farnesol působí synergicky k antimykotikům jako flukonazol, ketokonazol, mikonazol nebo amfotericin B. Aplikován spolu s antimykotiky vede k akumulaci ROS, které spouští apoptózu (Sharma & Prasad 2011).

Redukci růstu jednotlivých buněk a tvorbu hyf naopak podporuje tyrosol. Dokazuje to výzkum u *Candida albicans* a *C. tropicalis* (Cordeiro et al. 2015). Tento derivát tyrosinu je součástí EO z olivovníku *Olea europaea* a argánie *Argania spinosa* (Cicerale et al. 2010; El Abbassi et al. 2014). Je možné, že tyrosol zasahuje do biosyntézy ergosterolu, a tak synergicky může přispívat k účinkům antimykotik (Cordeiro et al. 2015). Další sloučeninou, která je důležitá pro quorum sensing je 2-fenylethanol, jenž je součástí EO např. z růže (*Rosa* sp.) a blokuje růst buňky a tvorbu vláken (Kruppa 2009).

8 Virulenční faktory

Mezi faktory virulence některých patogenních hub patří mimo jiné adheze k hostiteli, produkce enzymů a dalších látek umožňující patogenezí v hostiteli nebo tvorba biofilmů (Brunke et al. 2016). Cílení na virulenční faktory hub skýtá skvělé možnosti pro vývoj nových antifungálních léků (Gauwerky et al. 2009).

8.1 Inhibice produkce enzymů a dalších látek klíčových pro patogenezí

Jedním z podstatných virulenčních faktorů patogenních hub je produkce extracelulárních enzymů, které slouží k výživě houby, kolonizaci hostitele, šíření se v něm a obraně před imunitní odpovědí hostitele (Naglik et al. 2003). Tyto enzymy zahrnují u živočišných patogenů zejména proteasy (např. elastinasy, keratinasy, kolagenasy), lipasy

(zahrnující fosfolipasy) a deoxyribonukleasy (Martin et al. 2005; Viani et al. 2009). Jejich tvorba se liší v rámci druhů (Mahboubi et al. 2017) i jednotlivých kmenů (Höfling et al. 2011).

Esenciální oleje mohou enzymy produkované houbami inhibovat. Např. při aplikaci EO z koriandru *Coriandrum sativum* v minimální inhibiční koncentraci se slabě snížila proteolytická aktivita *Candida albicans* (Freires et al. 2014). Působením EO z meduňky *Melissa officinalis*, voňatky *Cymbopogon citratus*, pelargonie *Pelargonium graveolens* a hřebíčkovce *Syzygium aromaticum* se u *Candida albicans* snížila aktivita alkalické fosfatasy, esterasy, lipasy, leucinarylamidasy, naftyl-AS-BI-fosfohydrolasy a kyselé fosfatasy. Dále se snížil obsah α -glukosidasy a N-acetyl- β -glukosaminidasy u jednoho kmene *C. albicans*, který tyto enzymy produkoval (Budzyńska et al. 2014).

K invazi do hostitele jsou pro dermatofytické houby důležité keratinasy, které hydrolyzují keratin (Khan & Ahmad 2011). Většina keratinas izolovaných z dermatofytů byla popsána jako serinové proteasy (Monod et al. 2002). Působením EO z drsnoplodíku *Trachyspermum ammi* na dermatofytickou houbu *Microsporum canis* došlo ke snížení exprese genu kódujícího metaloproteasu (Khosravi et al. 2014), která vykazuje keratinolytickou aktivitu (Brouta et al. 2009). Aktivitu keratinas sekretovaných dermatofyty *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* a *Microsporum gypseum* inhiboval i EO z lipie *Lippia alba* bohatý na linalool (Costa et al. 2014). Činnost keratinas byla ovlivněna dále geraniolem a EO z voňatky *Cymbopogon martini* (Khan & Ahmad 2011).

Pro invazi dermatofyt i zástupců rodu *Aspergillus* je stěžejní produkce elastasy, které poškozují elastin (Khosravi et al. 2012; Viani et al. 2009). Elastické fibrily zajišťují pružnost kůže a chrání ji před tvorbou vrásek (Debelle & Tamburro 1999). Elastasy produkují též neutrofily, které hrají roli v tvorbě zánětu, jenž chrání organismus před infekcí (Braga et al. 2006).

Esenciálních olejů, které působí na elastasy hub, je celá řada. Např. aplikací EO ze skořicovníku *Cinnamomum verum*, voňatky *Cymbopogon martini* a dále čistých látek eugenolu, cinnamaldehydu a geraniolu došlo k signifikantnímu snížení elastasové aktivity u *Aspergillus fumigatus*. Nejvíce inhiboval cinnamaldehyd (95,56 %), poté *C. martini* (94,56 %) a *C. verum* (93,67 %) (Khan & Ahmad 2011). Elastasy poškozovaly různé EO z pelyňku *Artemisia sieberi*, které se lišily svým chemickým složením z důvodu sběru rostliny z různých lokalit a v rozdílných ročních obdobích. Nejeefektivněji inhibovaly elastasovou aktivitu EO, které měly za hlavní složky α -thujon a β -thujon (Mahboubi & Kazempour 2015).

Esenciální olej z badyáníku *Illicium anisatum* vykazoval antielastasovou aktivitu, nicméně pozorování nebylo provedeno na elastasach produkovaných houbami, ale na prasečí pankreatické elastase (Kim et al. 2009). Je známo, že tento EO vykazuje antifungální aktivitu – inhiboval různé houby, mimo jiné i *Trichophyton mentagrophytes* nebo *Candida albicans*. (Dzamic et al. 2009). EO z *I. anisatum* měl malou cytotoxicitu k lidským buňkám, proto nabízí potenciální využití ve vývoji nových léků proti dermatofytům (Kim et al. 2009). Elastasy produkované dermatofyty (*Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* a *T. schoenleini*) inhiboval rovněž silně EO ze *Zataria multiflora*, který obsahuje vysoký podíl thymolu a karvakrolu (Mahboubi et al. 2017).

Lipasy jsou enzymy hydrolyzující triacylglyceridy na glycerol a mastné kyseliny (Singh & Mukhopadhyay 2012). EO z cibule *Allium cepa*, česneku *Allium sativum* a šaebreje *Cuminum cyminum* způsobily pokles aktivity lipas u zástupců rodu *Aspergillus*. Nejvyšší snížení vykázal EO z cibule, který způsobil 66% pokles tvorby lipas u *A. parasiticus* var. *globosus* a úplně

redukoval jejich produkci u *A. fumigatus* (Hasan & Mahmoud 1993). Fosfolipasy hydrolyzují fosfolipidy v buněčné membráně (Budzyńska et al. 2014). Inhibice fosfolipas byla pozorována účinkem EO z bazalky *Ocimum tenuiflorum* na *Candida albicans* (Khan et al. 2014a).

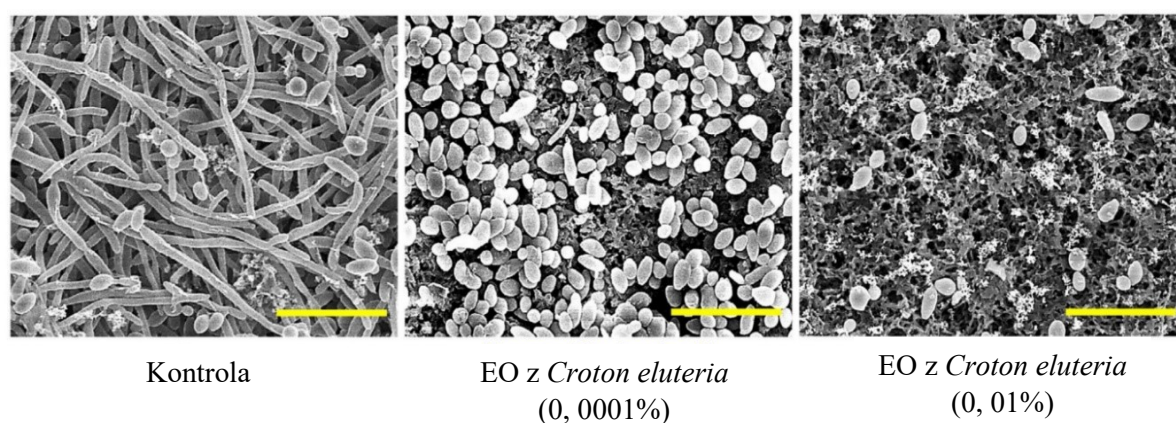
V patogenitě některých hub hraje významnou roli produkce hemolysinů, které rozkládají červené krvinky (Rodríguez-Cerdeira et al. 2019). EO z drsnoplodíku *Trachyspermum ammi* a tymiánu *Thymus vulgaris* inhiboval produkci hemolysinu různých zástupců rodu *Candida* (Khan et al. 2014b). Hemolytická aktivita byla snížena u *Candida albicans* i působením EO z meduňky *Melissa officinalis*, voňatky *Cymbopogon citratus*, pelargonie *Pelargonium graveolens* a hřebíčkovce *Syzygium aromaticum* (Budzyńska et al. 2014).

8.2 Snížení tvorby biofilmů

Biofilmy jsou vysoce organizovaná společenstva mikroorganismů přichycená k povrchu a obklopená extracelulární matrix, kterou mikroorganismy samy tvoří (Peixoto et al. 2017; Rodríguez-Cerdeira et al. 2019). Díky extracelulární matrix, která se skládá z proteinů, chitinu, DNA a β -1,3-glukanů, jsou mikroorganismy v biofilmech lépe chráněny před imunitním systémem hostitele a méně citlivé k antimikrobiálním látkám než buňky, které rostou jednotlivě (Ramage et al. 2009). Poněvadž jsou biofilmy rezervoárem chráněných organismů, jsou významným virulenčním faktorem (Freires et al. 2014; Manoharan et al. 2017b).

Tvorba biofilmů začíná, když jednotlivé organismy rozeznají povrch a přichytí se k němu. Pokud mají k dispozici dostatek živin, začnou tvořit matrix (Rodríguez-Cerdeira et al. 2019). Přichycení se děje díky hydrofobicitě povrchu buňky, elektrostatickým silám a na základě specifických adhezinů a dalších povrchových proteinů (Ramage et al. 2005).

Mnoho EO inhibuje tvorbu biofilmů. Příkladem může být EO z krotonu *Croton eluteria* (obr. 7) (Manoharan et al. 2017a). Tvorbu biofilmů snižoval i EO z listů a dřeva cedru *Cedrus libani*. V koncentraci 0,01 % jejich produkci redukoval o více než 85 %. Z cedrového oleje nejvíce snižují tvorbu biofilmů kafr, fenchon, fenchol, α -thujon a borneol. Působením kafru a fencholu byla potlačena exprese genů spojených s tvorbou hyf a adhezí (Manoharan et al. 2017b).



Obr. 7: Efekt EO z *Croton eluteria* na hyfální formaci biofilmů *Candida albicans*. Inhibice hyfálního růstu byla vizualizována skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM). Měřítka 20 μ m. Převzato a upraveno podle Manoharan et al. (2017a).

Jedním z možných mechanismů, jak mohou EO zabránit tvorbě biofilmů, může být inhibice adherence (Rane et al. 2014). Takto působí např. EO z koriandru *Coriandrum sativum*,

který vykazoval 42–85% inhibici adherence biofilmu v koncentraci 62,2 µg/ml na různé izoláty *Candida* (Freires et al. 2014). Počáteční adhezi inhiboval EO z vavřínu *Laurus nobilis*, který narušoval i již vzniklé biofilmy (Peixoto et al. 2017). Adheze může být snížena menší hydrofobicitou povrchu buňky, což způsobil např. EO z kajeputy *Melaleuca alternifolia* (Sudjana et al. 2012).

9 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované houbami. Mají různé funkce při uvolňování do potravin, které mimo jiné působí negativně na člověka. Mohou potlačovat růst a vývoj dětí, působit imunosupresi, mít karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky, poškozovat játra, ledviny, gastrointestinální trakt, nervový systém či vyvolávat deprese (Bryden 2019). Jedny z nejnebezpečnějších karcinogenů jsou aflatoxiny, z nich pak nejvíce aflatoxin B1 (Adebo et al. 2017).

Antimykotogenní mechanismus účinku EO ještě není zcela prozkoumán (Prakash et al. 2015). Inhibice růstu houby často koreluje s narušením tvorby mykotoxinů, avšak tato závislost není nezbytně nutná (Tatsadjieu et al. 2009). Někdy i malé koncentrace EO, které neinhibují růst, potlačují tvorbu aflatoxinu. Je možné, že je to způsobeno např. nedostatkem sporulace, který je vyvolán účinkem EO (Prakash et al. 2012). Inhibice aflatoxinu B1 dále může být důsledkem narušení katabolismu uhlovodíků v *Aspergillus flavus* tím, že jsou deaktivovány některé klíčové enzymy. S největší pravděpodobností dochází k tomuto narušení metabolismu působením EO z lipie *Lippia rugosa* (Tatsadjieu et al. 2009).

Pro syntézu aflatoxinu je důležitý acetyl-CoA, který vzniká v mitochondrii (Chanda et al. 2009). Proto narušení mitochondriálního respiračního řetězce může vyústit ve snížení tvorby aflatoxinu. Též narušení integrity membrány může vést k jeho nižší produkci. Tento mechanismus byl uvažován u EO z nestařce *Ageratum conyzoides* (Nogueira et al. 2010).

Houby vystavené oxidačnímu stresu zvyšují tvorbu aflatoxinu (Jayashree & Subramanyam 2000). EO mohou tomuto stresu zabránit. Buď reagují s ROS, které jsou způsobeny tvorbou aflatoxinů, nebo aktivují antioxidační enzymy v houbě (Alpsoy 2010; Kim et al. 2008). Např. kyselina kávová (která se nachází např. v EO z brukve *Brassica napus*, makadamie *Macadamia integrifolia* nebo olivovníku *Olea europaea*) indukuje geny kódující alkylhydroperoxidreduktasu v *Aspergillus flavus*, a tak je inhibována odpověď houby na oxidační stres (Kim et al. 2008). Dále přispívá k antiaflatoxigennímu účinku kyseliny kávové inhibice genů kódujících diacyl- a triacylglycerol lipasy (Kim et al. 2008). Je známo, že lipidy a jejich deriváty jako epoxymastné kyseliny stimulují nebo podporují tvorbu aflatoxinu (Fanelli & Fabbri 1989; Fanelli et al. 2009). Kyselina kávová kromě toho potlačuje expresi genu pro acyl-CoA dehydrogenasu, která katalyzuje dehydrogenaci acyl-CoA thioesterů na trans-2,3-enoyl CoA-produkty. Acyl-CoA dehydrogenasa je důležitý enzym v β-oxidaci, která hraje roli v biosyntéze aflatoxinu (Kim et al. 2008).

Produkcí aflatoxinu výrazně snižuje eugenol (Caceres et al. 2016). Je možné, že inhibuje biosyntézu aflatoxinu peroxidací lipidů a oxygenací. Při aplikaci eugenolu se snížila aktivita glukóza-6-fosfátdehydrogenasy, která udržuje redoxní potenciál na membráně a snižuje tak produkci NADPH, který je nutný pro tvorbu aflatoxinu (Shih & Marth 1974). Byla snížena též aktivita glutamátdehydrogenasy, což vedlo k redukci tvorby α-ketoglutarátu, který stimuluje biosyntézu aflatoxinu (Jayashree & Subramanyam 1999).

Inhibice genů eugenolem pozorovali Jahanshiri et al. (2015), kteří zjistili, že exprese několika genů důležitých pro syntézu aflatoxinu byla potlačena. Nejvíce ovlivněny byly geny kódující polyketidsyntasu, která je klíčová v iniciaci syntézy aflatoxinu, a další přeměňující sterigmatocystin na O-methylsterigmatocystin a dihydrosterigmatocystin na dihydro-O-methylsterigmatocystin (Jahanshiri et al. 2015).

V biosyntéze aflatoxinu B1 v *Aspergillus flavus* hraje roli 27 genů seskupených v 70kbp clusteru. Působením eugenolu byly všechny geny clusteru kromě jednoho inhibovány. Úplně byla inhibována exprese 19 z 27 genů, exprese dalších 5 genů byla snížena 10–20x. (Caceres et al. 2016). Syntézu aflatoxinu inhibuje např. i EO z kurkumy *Curcuma longa*, který pravděpodobně rovněž potlačuje expresi genů důležitých pro biosyntézu aflatoxinu (Hu et al. 2017).

Ne všechny komponenty EO narušují syntézu aflatoxinu, některé dokonce tvorbu aflatoxinu zvyšují. Např. 3-methyl-1-butanol, který je součástí EO např. z listů bavlíku (*Gossypium* sp.) zvýšil produkci aflatoxinu. Možná, že tato těkavá látka je prekurzorem aflatoxinu v časných stádiích jeho biosyntézy (Zeringue & McCormick 1990).

Esenciální oleje jsou využitelné pro prevenci a léčbu nádorových onemocnění (Bhalla et al. 2013). EO mohou snižovat vazbu aflatoxinu na DNA, což je pravděpodobně stěžejní pro karcinogenní proces. Toto navázání aflatoxinu na DNA ovlivňují např. EO z rostlin využívaných jako koření, např. muškátovník *Myristica fragrans*, zázvor *Zingiber officinale*, koriandr *Coriandrum sativum* a další (Aboobaker et al. 1994).

10 Vývoj houby

Esenciální oleje mohou inhibovat růst houby, tvorbu spor (např. vlivem na sporangia) (Soylu et al. 2006), snižovat jejich klíčení či vitalitu (Hu et al. 2017) nebo zabráňovat prodlužování klíčících hyf (Zhou et al. 2018a).

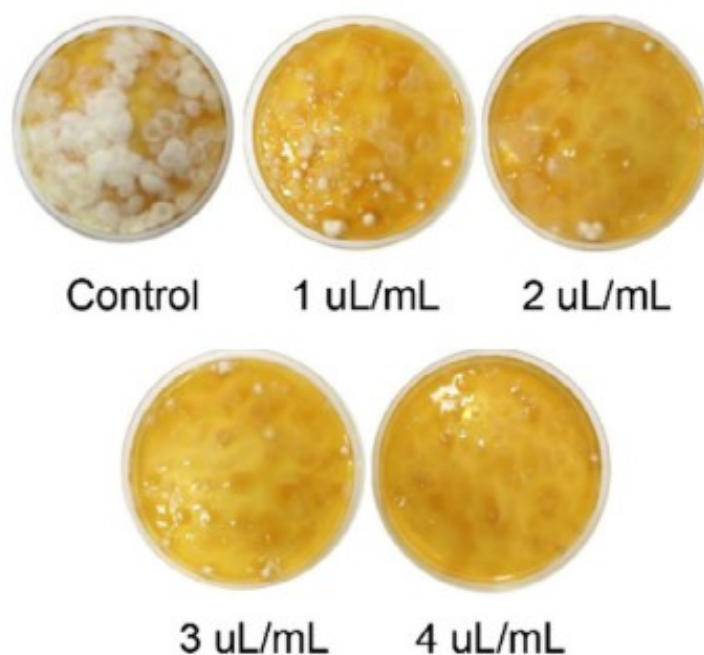
Co se týče omezení tvorby spor (sporulace), může po aplikaci EO docházet k redukci jejich množství vlivem na perцепci nebo transdukcii signálů zahrnutých v přeměně z vegetativního do reprodukčního vývoje (Tzortzakis & Economakis 2007). K inhibici tvorby spor přispívá rovněž zničení mycelia nebo potlačení růstu houby (Tian et al. 2011).

Některé EO snižují tvorbu sporangii. Soylu et al. (2006) pozorovali změny v tvorbě sporangii působením několika EO ne u houby, ale u zástupce třídy *Peronosporomycota* – *Phytophthora infestans*. Nejvíce inhiboval tvorbu sporangii EO z dobromysli *Origanum syriacum* subs. *bevanii* a poté EO z *Thymbra spicata* a fenyklu *Foeniculum vulgare*.

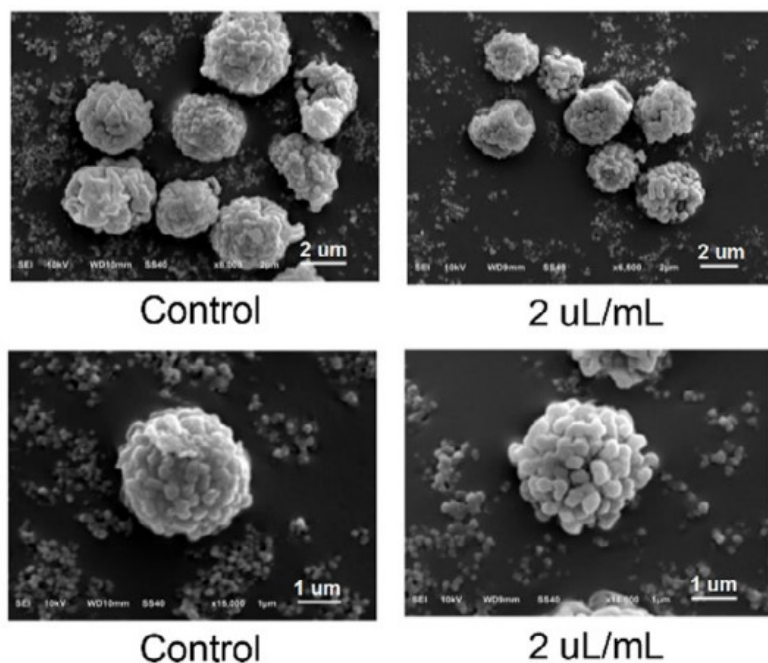
Příkladem esenciálních olejů, které inhibovaly klíčení spor, jsou EO ze skořicovníku *Cinnamomum jensenianum* (Tian et al. 2012b) a kurkumy *Curcuma longa* (obr. 8) (Hu et al. 2017). Tyto oleje snížily klíčivost spor u *Aspergillus flavus*. EO z kurkumy *C. longa* u *A. flavus* navíc ovlivnil i morfologii spor. Spory bez ošetření EO měly oválný tvar a hladký povrch, spory po aplikaci EO měly naopak drsné stěny s nerovnostmi na svém povrchu (obr. 9) (Hu et al. 2017).

Esenciální oleje mají často větší vliv na růst klíčící hyfy než na samotný hyfální růst. To bylo pozorováno např. u EO z kajeputu *Melaleuca alternifolia* na *Candida albicans* (Carson et al. 2006). Stejně tak snížení tvorby klíčících hyf v subinhibičních koncentracích (koncentracích menších než je nutné pro potlačení růstu) vykazovaly EO z různých druhů tymiánu (*Thymus* sp.) na různé druhy rodu *Candida* (Pina-Vaz et al. 2004) a EO z ločidlovky (metlovky)

Ferulago capillaris, který téměř úplně inhiboval tvorbu klíční hyfy u *Candida albicans* v koncentraci 1/16 MIC (Pinto et al. 2013).



Obr. 8: Efekt různých koncentrací EO z *Curcuma longa* na klíčení spor *Apergillus flavus*. Převzato z Hu et al. (2017).



Obr. 9: Změna morfologie spor *Aspergillus flavus* po ošetření EO z *Curcuma longa* vizualizované v SEM. Vlevo spory bez EO, vpravo aplikace 2 μl/ml EO. Převzato z Hu et al. (2017).

Nicméně některé látky z EO mohou klíčení stimulovat. Např. limonen, α -pinen, β -pinen a myrcen obsažené v různých citrusech (*Citrus* sp.) stimulovaly prodlužování klíční hyfy u *Penicillium digitatum* a *P. italicum*. Je zajímavé, že se míra stimulace těchto látek lišila.

U *P. italicum* nejvyšší stimulační aktivitu vykazoval limonen, u *P. italicum* pak myrcen. Limonen, α -pinen, β -pinen a myrcen aplikované na *P. expansum* a *Botrytis cinerea* (houby, jež nejsou patogenní na citrusech) neměly žádný efekt na klíčení nebo ho inhibovaly (Droby et al. 2008). Dalším příkladem stimulace klíčení je EO z kajeputu *Melaleuca alternifolia*, který v nízkých koncentracích stimuloval růst různých druhů hlívy rodu *Pleurotus*. Zároveň však inhiboval klíčení spor *Trichoderma harzianum*, houby, která kontaminuje kultury *Pleurotus* sp. a způsobuje tak ekonomické škody. Tento olej proto skýtá potenciální využití v boji proti této mikroskopické houbě jako alternativa k syntetickým chemikáliím (Angelini et al. 2008).

11 Závěr

Esenciální oleje působí u hub negativně na různé struktury a buněčné procesy. Ovlivňují plazmatickou membránu, mitochondrii, buněčnou stěnu i jádro. Dále mohou ovlivňovat quorum sensing, zabraňovat tvorbě biofilmu, klíčení a tvorbě spor nebo inhibovat produkci mykotoxinů a enzymů syntetizovaných patogenními druhy. Z těchto mechanismů je ve studiích nejčastěji zmiňovaný vliv na membránu, především na plazmatickou, což je dáno lipofilním charakterem EO, který zajišťuje snazší průnik lipidovou dvojrůstvou. Působením EO dochází k narušení integrity a fluidity plazmatické membrány, snižuje se syntéza ergosterolu, základní stavební jednotky membrány, a jsou často inhibovány H^+ ATPasy, které jsou stěžejní pro správné fungování buňky. Některé EO fungují dále jako antioxidanty, další naopak indukují tvorbu ROS. Méně často EO působí na buněčnou stěnu a na jádro.

Z uvedených mechanismů účinků EO mě nejvíce zaujala inhibice tvorby biofilmů, poněvadž znemožnění jejich tvorby vede ke ztrátě ochrany buněk hub před imunitním systémem hostitele a k citlivosti na antimikrobiální látky (viz kap. 8.2). Zajímavou se jeví také antielastasová aktivita EO z badyáníku *Illicium anisatum* přímo na dermatofytech (Kim et al. 2009). Velice pozoruhodným mechanismem je rovněž inhibice exprese genů, které kódují efluxní pumpy při působení thymolu a karvakrolu, kde se tímto mechanismem může zamezit vzniku rezistence k flukonazolu (Ahmad et al. 2013).

Většina dosud prováděných výzkumů zabývajících se efektem EO na houby a zmíněných v této bakalářské práci se zaměřovala především na houby jako *Candida* sp., (zvláště *Candida albicans*), různé zástupce rodu *Aspergillus* (nejvíce *A. flavus*), *Saccharomyces cerevisiae* a méně pak na některé další druhy, jež jsou patogenní na rostlinách nebo způsobují kontaminaci potravin – např. *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea* nebo *Penicillium digitatum*. Některé studie pojednávaly i o působení na dermatofyty, nicméně přesnější nalezení mechanismu jejich působení by bylo žádoucí.

Esenciální oleje využívané pro výzkum bývají nejčastěji z tymiánu (*Thymus* sp.), kajeputu (*Melaleuca alternifolia*), dobromysli (*Origanum* sp.), muškátovníku (*Myristica fragrans*), skořicovníku (*Cinnamomum* sp.), koriandru (*Coriandrum sativum*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*), šalvěje (*Salvia* sp.), voňatky (*Cymbopogon* sp.), bazalky (*Ocimum* sp.), hřebíčkovce (*Syzygium aromaticum*), máty (*Mentha* sp.) nebo kurkumy (*Curcuma longa*). Z čistých látek, jež jsou součástí EO, vykazovaly antifungální aktivitu především thymol, karvakrol, eugenol, citral nebo geraniol.

Některé články byly zatíženy interpretačními problémy. Např. Mahboubi & Kazempour (2015) uváděli, že vysoká elastasová aktivita způsobila ochranu proti zánětu. Převzali výsledky od Braga et al. (2006), kteří naopak psali, že elastasy k zánětu přispívaly.

V posledním desetiletí se výrazně zvýšila rezistence vůči klinicky využívaným antitykotikům (von Lilienfeld-Toal et al. 2019) a rovněž počet pacientů trpících mykotickými

infekcemi (Fuentefria et al. 2018). Dostupná antimykotika jsou navíc pro člověka často toxická. Z těchto důvodů je objevování nových antifungálních látek velice důležité. EO ze své podstaty nabízejí velmi pestrou paletu možných nových antimykotik využitelných v terapii. Další možnou cestou, kterou by se mohl výzkum ubírat, je použití stávajících antimykotik s podporou EO. V mnoha studiích byl totiž pozorován synergický efekt EO ke klinicky využívaným antimykotikům (Amber et al. 2010; Curvelo et al. 2014; Shin & Kang 2003). Tím by bylo možné snížit dávkování konvenčních antimykotik, a tak se vyhnout i některým nežádoucím účinkům závislým na dávce.

Jistým limitem této práce je fakt, že jsem se zabývala účinky EO na houby zejména z kvalitativního hlediska. Nezkoumala jsem tedy kvantitativní účinnost jednotlivých látek, což by bylo zajímavé právě z hlediska výše zmíněného možného následného terapeutického využití u pacientů. Je totiž popsáno, že některé EO mohou inhibovat růst hub více, další naopak méně nebo srovnatelně (Bansod & Rai 2008).

Zajímavé by bylo rovněž podrobněji zkoumat efekt EO nejen *in vitro*, což bylo předmětem studií citovaných v této práci, ale rovněž přímo *in vivo*, kdy by se jednalo již o určitou formu klinického testování léčiv. Některé EO v léčbě mykotických infekcí již byly testovány (Harris 2002). Nicméně např. k terapii onemocnění způsobených kvasinkou *Candida* sp. se dosud žádné EO dle dostupné literatury standardně v konvenční medicíně nevyužívají. Je to z důvodu nedostatečných informací o jejich mechanismech působení a jejich potenciálních vedlejších účincích (Budzyńska et al. 2014). Proto znalost přesných mechanismů účinků může přispět k budoucímu uvedení EO do klinické praxe. Z tohoto důvodu bych se ráda ve své diplomové práci zabývala konkrétními oleji a jejich vlivu na houby.

12 Reference

- Aboobaker VS, Bhattacharya RK, Rao AR. 1994. Modulatory effects of essential oils from spices on the formation of DNA adduct by Aflatoxin B1 *in vitro*. *Nutr. Cancer*. 21(2):169–75
- Adebo OA, Njobeh PB, Gbashi S, Nwinyi OC, Mavumengwana V. 2017. Review on microbial degradation of aflatoxins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57(15):3208–17
- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, et al. 2011a. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(1):41–50
- Ahmad A, Khan A, Kumar P, Bhatt RP, Manzoor N. 2011b. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast*. 28(8):611–17
- Ahmad A, Khan A, Manzoor N. 2013. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48(1–2):80–86
- Ahmad A, Khan A, Yousuf S, Khan LA, Manzoor N. 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*. 81(8):1157–62
- Akhtar MS, Degaga B, Azam T. 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues Biol. Sci. Pharm. Res.* 2(1):1–7
- Akins RA. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 43(4):285–318
- Alizadeh F, Khodavandi A, Esfandyari S, Nouripour-sisakht S. 2018. Analysis of ergosterol and gene expression profiles of sterol. *J. Herbmed Pharmacol.* 7(2):79–87
- Alps L. 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *African J. Biotechnol.* 9(17):2474–81
- Amber K, Aijaz A, Immaculata X, Luqman KA, Nikhat M. 2010. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*. 17(12):921–25
- Anderson AC, Perry KM, Freymann DM, Stroud RM. 2000. The crystal structure of thymidylate synthase from *Pneumocystis carinii* reveals a fungal insert important for drug design. *J. Mol. Biol.* 297(3):645–57
- Angelini P, Pagiotti R, Granetti B. 2008. Effect of antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on antagonistic potential of *Pleurotus* species against *Trichoderma harzianum* in dual culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24(2):197–202
- Ashour ML, El-Readi M, Youns M, Efferth T, Mulyaningsih S, et al. 2009. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 61(8):1079–87
- Bailey-Serres J, Mittler R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 141(2):311
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446–75

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Zhiri A, Idaomar M. 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585(1–2):1–13
- Bang K-H, Lee D-W, Park H-M, Rhee Y-H. 2005. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(5):1061–63
- Bansod S, Rai M. 2008. Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J. Med. Sci.* 3(2):81–88
- Bard M, Albrecht MR, Gupta N, Guynn CJ, Stillwell W. 1988. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids.* 23(6):534–38
- Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. 2013. Anticancer activity of essential oils: A review. *J. Sci. Food Agric.* 93(15):3643–53
- Bhatia R, Shreaz S, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, et al. 2012. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *J. Basic Microbiol.* 52(5):504–12
- Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L. 2006. Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil Elastase. *Pharmacology.* 77(3):130–36
- Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. 2009. Purification and characterization of a 43·5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis* . *Med. Mycol.* 39(3):269–75
- Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. 2016. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr. Opin. Microbiol.* 32:89–95
- Bryden WL. 2019. Mycotoxins in the food chain and human health implications. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* (December 2018):
- Budzyńska A, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Rózalska B. 2014. Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oilswith EOs at. *Acta Biochim. Pol.* 61(1):115–21
- Caceres I, El Khoury R, Medina Á, Lippi Y, Naylies C, et al. 2016. Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a large-scale q-PCR approach. *Toxins (Basel).* 8(5):123
- Carnesecchi S, Bras-Gonçalves R, Bradaia A, Zeisel M, Gossé F, et al. 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* 215(1):53–59
- Carson CF, Hammer KA, Riley T V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1):50–62
- Cassella S, Cassella JP, Smith I. 2002. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *Int. J. Aromather.* 12(1):2–15
- Chanda A, Roze L V., Kang S, Artymovich KA, Hicks GR, et al. 2009. A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(46):19533–38
- Chekem MSG, Lunga PK, Tamokou JDD, Kuiate JR, Tane P, et al. 2010. Antifungal

- properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. *Pharmaceuticals*. 3(9):2900–2909
- Chen Y, Zeng H, Tian J, Ban X, Ma B, Wang Y. 2013. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 62(PART8):1175–83
- Choi S-W, Benzie IFF, Ma S-W, Strain JJ, Hannigan BM. 2008. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? *Free Radic. Biol. Med.* 44(7):1217–31
- Cicerale S, Lucas L, Keast R, Cicerale S, Lucas L, Keast R. 2010. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* 11(2):458–79
- Cordeiro R de A, Teixeira CEC, Brillhante RSN, Castelo-Branco DSCM, Alencar LP, et al. 2015. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Res.* 15(4):
- Cortés JCG, Curto MÁ, Carvalho VSD, Pérez P, Ribas JC. 2019. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnol. Adv.*
- Costa DCMH, Vermelho AB, Almeida CA, De Souza Dias EP, Cedrola SML, et al. 2014. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29(1):12–17
- Cotoras M, Melo R, Mendoza L, Castro P, Vivanco H. 2013. Farnesol induces apoptosis-like phenotype in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mycologia*. 105(1):28–33
- Curvelo JAR, Marques AM, Barreto ALS, Romanos MTV, Portela MB, et al. 2014. A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. *J. Med. Microbiol.* 63(PART 5):697–702
- Darvishi E, Omidi M, Bushehri AAS, Golshani A, Smith ML. 2013a. The antifungal wugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. *PLoS One*. 8(10):e76028
- Darvishi E, Omidi M, Bushehri AA, Golshani A, Smith ML. 2013b. Thymol antifungal mode of action involves telomerase inhibition. *Med. Mycol.* 51(8):826–34
- Davis-Hanna A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA. 2007. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 67(1):47–62
- Debelle L, Tamburro AM. 1999. Elastin: molecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(2):261–72
- Dorman HJD, Surai P, Deans SG. 2000. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *J. Essent. Oil Res.* 12(2):241–48
- Droby S, Eick A, Macarasin D, Cohen L, Rafael G, et al. 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biol. Technol.* 49(3):386–96
- Dzamic A, Sokovic M, Ristic MS, Grijic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD. 2009. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chem. Nat. Compd.* 45(2):259–61
- Edris AE. 2007. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phyther. Res.* 21(4):308–23

- El-Enshasy HA. 2007. Filamentous fungal cultures-process characteristics, products and applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, ed. S-T Yang, pp. 225–61. Elsevier
- El Abbassi A, Khalid N, Zbakh H, Ahmad A. 2014. Physicochemical characteristics, nutritional properties, and health benefits of argan oil: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54(11):1401–14
- Fanelli C, Fabbri AA. 1989. Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia.* 107(2–3):115–20
- Fanelli C, Fabbri AA, Finotti E, Passi S. 2009. Stimulation of aflatoxin biosynthesis by lipophilic epoxides. *Microbiology.* 129(6):1721–23
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23(4):213–26
- Free SJ. 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. In *Advances in Genetics*, Vol. 81, eds. T Friedmann, JC Dunlap, SF Goodwin, pp. 33–82. Elsevier Inc. 1st ed.
- Freires I de A, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, Alencar SM de, et al. 2014. *Coriandrum sativum* L. (coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One.* 9(6):e99086
- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Zhe Wang SS, Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytoterapy Res.* 21:984–94
- Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. 2018. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett. Appl. Microbiol.* 66(1):2–13
- Gasparetto A, Bella Cruz A, Wagner TM, Bonomini TJ, Correa R, Malheiros A. 2017. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. *Ind. Crops Prod.* 95:256–63
- Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. 2009. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov. Today.* 14(3–4):214–22
- Ghfir B, Fonvieille JL, Koulali Y, Ecalle R, Dargent R. 1994. Effect of essential oil of *Hyssopus officinalis* on the lipid composition of *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia.* 126(3):163–67
- Hammer KA, Carson CF, Riley T V. 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(6):1081–85
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29(2):345–50
- Haque E, Irfan S, Kamil M, Sheikh S, Hasan A, et al. 2016. Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 85(4):436–43
- Hara MR, Cascio MB, Cheah JH, Kim SF, Snyder SH, et al. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* 7(7):665–74

- Harris R. 2002. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int. J. Aromather.* 12(2):83–91
- Hasan HAH, Mahmoud A-LE. 1993. Inhibitory effect of spice oils on lipase and mycotoxin production. *Zentralbl. Mikrobiol.* 148(8):543–48
- He M, Du M, Fan M, Bian Z. 2007. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 163(3):137–43
- Helal GEDA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, Abou El-Khair EK. 2007. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *J. Basic Microbiol.* 47(1):5–15
- Höfling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA. 2011. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and Proteinases. *Mycopathologia.* 172(2):117–24
- Holtz RW. 2009. *In vitro* methods to screen materials for anti-aging effects. In *Skin Aging Handbook*, ed. N Dayan, pp. 329–62. William Andrew Inc.
- Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chem.* 220(1):1–8
- Hua H, Xing F, Selvaraj JN, Wang Y, Zhao Y, et al. 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PLoS One.* 9(9):e108285
- Jahanshiri Z, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. 2015. Inhibitory effect of eugenol on aflatoxin B1 production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(7):1071–78
- Jayashree T, Subramanyam C. 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lett. Appl. Microbiol.* 28(3):179–83
- Jayashree T, Subramanyam C. 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic. Biol. Med.* 29(10):981–85
- Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S. 2010. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complement. Altern. Med.* 10(1):77
- Kang K, Fong W-P, Tsang PW-K. 2010. Novel antifungal activity of purpurin against *Candida* species *in vitro*. *Med. Mycol.* 48(7):904–11
- Kavoosi G, Teixeira da Silva JA. 2012. Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in glucose-stimulated human monocyte. *Food Chem. Toxicol.* 50(9):3079–85
- Kedia A, Dwivedy AK, Jha DK, Dubey NK. 2016. Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. *Protoplasma.* 253(3):647–53
- Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, et al. 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 161(10):816–23
- Khan A, Ahmad A, Xess I, Khan LA, Manzoor N. 2014a. *Ocimum sanctum* essential oil

- inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 21(4):448–52
- Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F. 2014b. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complement. Altern. Med.* 14(1):337
- Khan MSA, Ahmad I. 2011. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*. 19(1):48–55
- Khosravi AR, Mahdavi Omran S, Shokri H, Lotfi A, Moosavi Z. 2012. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. *J. Mycol. Med.* 22(2):167–72
- Khosravi AR, Shokri H, Sohrabi N. 2014. Potential effects of *Trachyspermum copticum* essential oil and propolis alcoholic extract on Mep3 gene expression of *Microsporum canis* isolates. *J. Mycol. Med.* 24(3):e101–7
- Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z. 2004. Evaluation of antioxidant activity of australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem.* 52(10):2849–54
- Kim J, Kim S, Oh T, Baik JS, Song Q, et al. 2009. Chemical composition, antioxidant, anti-elastase, and anti-inflammatory activities of *Illicium anisatum* essential oil. *Acta Pharm.* 59(3):289–300
- Kim JH, Yu J, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, et al. 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 122(1–2):49–60
- Knežević-Vukčević J, Vuković-Gačić B, Stević T, Stanojević J, Nikolić B, Simić D. 2009. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against UV-induced mutations in bacterial and yeast cells. *Arch. Biol. Sci.* 57(3):163–72
- Koul O, Suresh W, Dhaliwal G. 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4(1):63–84
- Kruppa M. 2009. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 52(1):1–10
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia - reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33(6):1065–89
- Li MY, Lai GY, Wang J, Ye DX. 2012. The inhibition of eugenol on glucan is essential for the biofilm eradication effect on caries-related biofilm in an artificial mouth model. *Nat. Prod. Res.* 26(12):1152–55
- Li W-R, Shi Q-S, Dai H-Q, Liang Q, Xie X-B, et al. 2016. Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* 6(1):22805
- Lima IO, De Oliveira Pereira F, De Oliveira WA, De Oliveira Lima E, Menezes EA, et al. 2013. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J. Essent. Oil Res.* 25(2):138–42
- Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* 13(2):98–104
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to

- azole antifungals. *Trends Mol. Med.* 8(2):76–81
- Machida K, Tanaka T. 1999. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F_0F_1 -ATPase in yeast. *FEBS Lett.* 462(1–2):108–12
- Mahboubi M, HeidaryTabar R, Mahdizadeh E. 2017. The anti-dermatophyte activity of *Zataria multiflora* essential oils. *J. Mycol. Med.* 27(2):232–37
- Mahboubi M, Kazempour N. 2015. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. *J. Mycol. Med.* 25(2):e65–71
- Manoharan RK, Lee J-H, Kim Y-G, Kim S-I, Lee J. 2017a. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Biofouling.* 33(2):143–55
- Manoharan RK, Lee J-H, Lee J. 2017b. Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* 8:1476
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89(3):411–20
- Manzoor N, Amin M, Khan LA. 2002. Effect of phosphocreatine on H^+ extrusion, pH and dimorphism in *Candida albicans*. *Indian J. Exp. Biol.* 40(7):785–90
- Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol.* 67(3):187–95
- Martin S, Claudia B, Hans CK, Bernhard H. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 48(6):365–77
- Mau J-L, Lai EY., Wang N-P, Chen C-C, Chang C-H, Chyau C-C. 2003. Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chem.* 82(4):583–91
- Miguel G, Simões M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* 86(2):183–88
- Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, Mihajlović B, Matavulj M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 69(5):413–19
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. 2015. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 28:73–80
- Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* 292(5–6):405–19
- Moore D, Robson GD, Trinci APJ. 2013. *21st Century Guidebook to Fungi*, Vol. 49
- Morace G, Perdoni F, Borghi E. 2014. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2(4):254–59
- Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. 2012. Amino acid substitutions in

- the *Candida albicans* sterol 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(9):2131–38
- Naeini A, Shokri H. 2012. Chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oil from *Cuminum cyminum* against various *Aspergillus* strains. *J. Med. Plants Res.* 6(9):1702–6
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3):400–428, table of contents
- Nakamura CV, Ishida K, Faccin LC, Filho BPD, Cortez DAG, et al. 2004. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. *Res. Microbiol.* 155(7):579–86
- Nogueira JHC, Gonçalves E, Galletti SR, Facanali R, Marques MOM, Felício JD. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* 137(1):55–60
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11(6):272–79
- OuYang Q, Tao N, Jing G. 2016. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. *BMC Genomics.* 17(1):599
- Padder SA, Prasad R, Shah AH. 2018. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol. Res.* 210(January):51–58
- Parveen M, Hasan MK, Takahashi J, Murata Y, Kitagawa E, et al. 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(1):46–55
- Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B. 2016. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.* 58(1):81–85
- Pauli A. 2006. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med. Res. Rev.* 26(2):223–68
- Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, et al. 2017. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch. Oral Biol.* 73:179–85
- Pina-Vaz C, Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Martinez-de-Oliveira J, et al. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oil and their major compounds. *J. Eur. Acadamy Dermatology Venereol.* 18:73–78
- Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Gonçalves MJ, et al. 2013. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32(10):1311–20
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, et al. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 55(10):1367–73
- Prakash B, Kedia A, Mishra PK, Dubey NK. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food

- commodities – Potentials and challenges. *Food Control*. 47:381–91
- Prakash B, Singh P, Kedia A, Singh A, Dubey NK. 2012. Efficacy of essential oil combination of *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* rosc. as a postharvest fungitoxicant, aflatoxin inhibitor and antioxidant agent. *J. Food Saf.* 32(3):279–88
- Prasad CS, Shukla R, Kumar A, Dubey NK. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. *Mycoses*. 53(2):123–29
- Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*. 63(5):569–75
- Rajput SB, Karuppayil SM. 2013. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Springerplus*. 2(1):26
- Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 35(4):340–55
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot. Cell*. 4(4):633–38
- Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11):5459–63
- Rane HS, Bernardo SM, Howell AB, Lee SA. 2014. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(2):428–36
- Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(12):5062–69
- Rasooli I, Owlia P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. 66(24):2851–56
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. *Food Control*. 17(5):359–64
- Raut JS, Karuppayil SM. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62:250–64
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal*. 24(5):981–90
- Razzaghi-Abyaneh M, Rai M, eds. 2013. Plant essential oils as antifungal treatments on the postharvest of fruit and vegetables. In *Antifungal Metabolites from Plants*, pp. 429–46
- Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenás A, Fabbrocini G, et al. 2019. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 174:110–25
- Ruberto G, Baratta MT. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69(2):167–74
- Saad NY, Muller CD, Lobstein A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* 28(5):269–79

- Samber N, Khan A, Varma A, Manzoor N. 2015. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharm. Biol.* 53(10):1496–1504
- Sant'Anna JR de, Franco CC da S, Miyamoto TC, Cunico MM, Miguel OG, et al. 2009. Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phyther. Res.* 23:231–235
- Serrano R. 1983. *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156(1):11–14
- Seto-Young D, Monk B, Mason AB, Perlin DS. 1997. Exploring an antifungal target in the plasma membrane H⁺-ATPase of fungi. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1326(2):249–56
- Shahina Z, El-Ganiny AM, Minion J, Whiteway M, Sultana T, Dahms TES. 2018. *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil induces cell wall remodelling and spindle defects in *Candida albicans*. *Fungal Biol. Biotechnol.* 5(1):3
- Shao X, Cheng S, Wang H, Yu D, Mungai C. 2013. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.* 114(6):1642–49
- Sharma M, Prasad R. 2011. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(10):4834–43
- Shen Q, Zhou W, Li H, Hu L, Mo H. 2016. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. *PLoS One.* 11(5):e0155647
- Shih C-N, Marth EH. 1974. Aflatoxin formation, lipid synthesis, and glucose metabolism by *Aspergillus parasiticus* during incubation with and without agitation. *Biochim. Biophys. Acta.* 338:286–96
- Shin S, Kang C-A. 2003. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Lett. Appl. Microbiol.* 36(2):111–15
- Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine.* 19(1):42–47
- Simon GR, Costa RR, Gandara DR. 2018. Pharmacogenomics in lung cancer: predictive biomarkers for chemotherapy. In *IASLC Thoracic Oncology*, pp. 466–78
- Singh AK, Mukhopadhyay M. 2012. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166(2):486–520
- Sivakumar D, Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot.* 64:27–37
- Soylu EM, Soyly S, Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia.* 161(2):119–28
- Stević T, Berić T, Šavikin K, Soković M, Gođevac D, et al. 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Ind. Crops Prod.* 55:116–22

- Sud IJ, Feingold DS. 1981. Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles. *J. Invest. Dermatol.* 76(6):438–41
- Sudjana AN, Carson CF, Carson KC, Riley T V., Hammer KA. 2012. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Med. Mycol.* 50(8):863–70
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2016:3012462
- Tabatabaie T, Potts JD, Floyd RA. 1996. Reactive Oxygen Species-Mediated Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 336(2):290–96
- Takemoto D, Tanaka A, Scott B. 2007. NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet. Biol.* 44(11):1065–76
- Tatsadjieu NL, Dongmo PMJ, Ngassoum MB, Etoa F-X, Mbofung CMF. 2009. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control.* 20(2):161–66
- Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, et al. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* 84(4):519–25
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. 2012a. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One.* 7(1):e30147
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.* 145(2–3):464–70
- Tian J, Huang B, Luo X, Zeng H, Ban X, et al. 2012b. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chem.* 130(3):520–27
- Tian J, Lu Z, Wang Y, Zhang M, Wang X, et al. 2017. Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca²⁺ and ROS in *Candida albicans*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 85:114–22
- Tian J, Zeng X, Feng Z, Miao X, Peng X, Wang Y. 2014. *Zanthoxylum molle* Rehd. essential oil as a potential natural preservative in management of *Aspergillus flavus*. *Ind. Crops Prod.* 60:151–59
- Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Zad SJ, et al. 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int. J. Food Microbiol.* 139(3):127–33
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, et al. 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* 89(4):549–54
- Tzortzakis NG, Economakis CD. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8(2):253–58

- Ukic NM, Bozin B, Sokovic M, Simin N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 52:2485–89
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 5(2):145–52
- Vanden Bossche H, Koymans L, Moereels H. 1995. P450 inhibitors of use in medical treatment: Focus on mechanisms of action. *Pharmacol. Ther.* 67(1):79–100
- Viani FC, Santos JI Dos, Paula CR, Larson CE, Gambale W. 2009. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. *Med. Mycol.* 39(5):463–68
- von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. 2019. Invasive fungal infection. *Dtsch. Aerzteblatt Online*. 116(16):271–78
- Vuković-Gačić B, Nikčević S, Berić-Bjedov T, Knežević-Vukčević J, Simić D. 2006. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.* 44(10):1730–38
- Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, et al. 2013. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J. Oral Microbiol.* 5:22434
- Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL. 2009. Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137(3):723–29
- Yutani M, Hashimoto Y, Ogita A, Kubo I, Tanaka T, Fujita K. 2011. Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phyther. Res.* 25(11):1707–13
- Zeng H, Chen X, Liang J. 2015. In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 64(1):93–103
- Zeringue HJ, McCormick SP. 1990. Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicon*. 28(4):445–48
- Zhou L-J, Li F-R, Huang L-J, Yang Z-R, Yuan S, et al. 2016. Antifungal activity of eucalyptus oil against rice blast fungi and the possible mechanism of gene expression pattern. *Molecules*. 21(5):621
- Zhou T, Wang X, Ye B, Shi L, Bai X, Lai T. 2018a. Effects of essential oil decanal on growth and transcriptome of the postharvest fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol. Technol.* 145:203–12
- Zhou Y, Liao M, Zhu C, Hu Y, Tong T, et al. 2018b. ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection. *Int. J. Oral Sci.* 10(2):9
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 18(13):1181–90